



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0123906
(43) 공개일자 2023년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/73 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/22 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/73 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0098280(분할)

(22) 출원일자 2023년07월27일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2022-0113158

원출원일자 2022년09월07일

심사청구일자 2022년09월07일

(30) 우선권주장

1020210119674 2021년09월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

에이피알지 주식회사

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 19층
1911호(영덕동, 유타워)

중앙대학교 산학협력단

서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

강세찬

경기도 성남시 분당구 정자로 143, 402동 301호

서영진

서울특별시 관악구 성현로 80, 143동 103호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

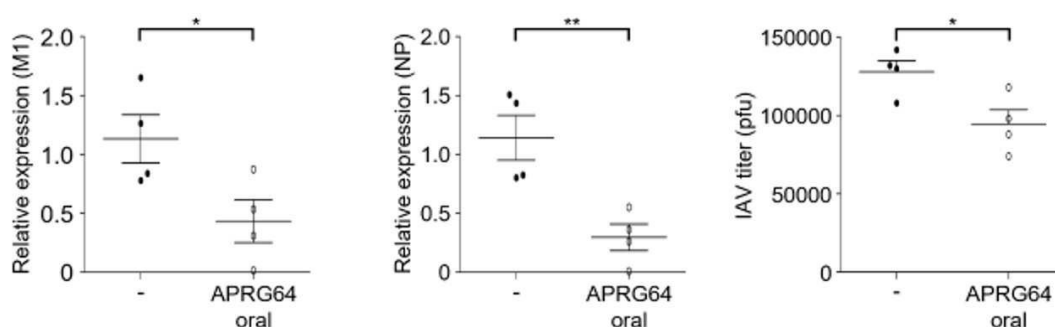
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*)추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 인체에 부작용이 없어 안전성이 우수하면서도, 바이러스 의존적인 경로를 통한 세포병변 효과, 인플루엔자 바이러스 관련 유전자 감소 효과 등에 따른 항바이러스 활성이 뛰어나다. 이에 더하여, 생체 내에서도 항바이러스 효과가 확인되었을 뿐만 아니라, 혼합 추출물의 활성 성분 역시 현저히 우수한 항바이러스 활성을 가진다는 점에서 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도10d



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/19 (2013.01)

A61K 31/352 (2023.05)

A61K 31/7048 (2013.01)

A61K 36/22 (2013.01)

A61K 8/498 (2013.01)

A61K 8/602 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 31/16 (2018.01)

(71) 출원인

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김형건

경기도 과천시 별양로 12, 328동 1701호

이영근

경기도 수원시 영통구 영통로90번길 4-27, 109동 2003호

최순호

경기도 수원시 영통구 영통로 498, 136동 706호

명세서

청구범위

청구항 1

선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출되는 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 30 내지 95% 에탄올을 사용하여 추출된 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 혼합물은 선학초 추출물 : 오배자 추출물의 중량비가 10:1 내지 1:10이 되도록 혼합되는 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A형 H1N1 바이러스인 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

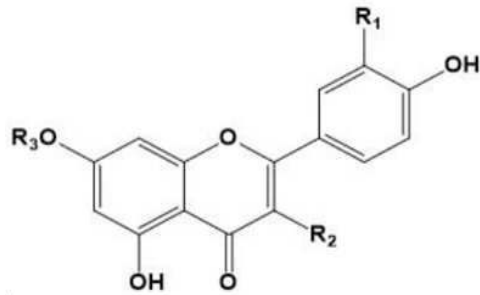
제1항에 있어서,

상기 혼합물은 인플루엔자 바이러스의 M1 또는 NP 유전자의 발현을 억제시키는 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



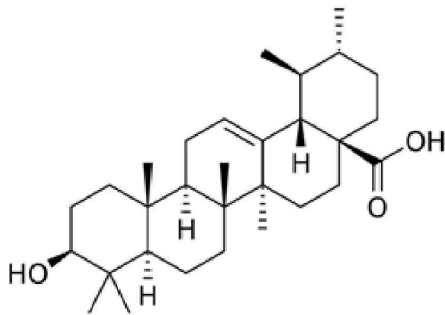
상기 화학식에서,

R₁은 H 또는 OH이고,

R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[화학식 2]



청구항 8

제7항에 있어서,

상기 플라보노이드(flavonoid) 화합물은 아프젤린(Afzelin), 아피제닌(Apigenin), 아피제닌 7-O-β-D-글루쿠로나이드(Apigenin 7-O-β-D-glucuronide), 아스트라갈린(Astragalin), 니코티플로린(Nicotiflorin), 케르세틴(Quercetin), 케르시트린(Quercitrin), 및 루틴(Rutin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 트리테르펜(triterpenoid) 화합물은 우르솔산(Ursolic acid)인 것인 플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

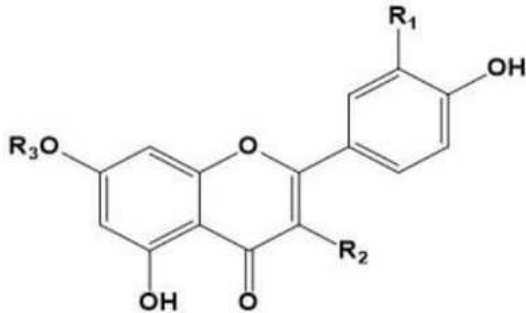
청구항 10

선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



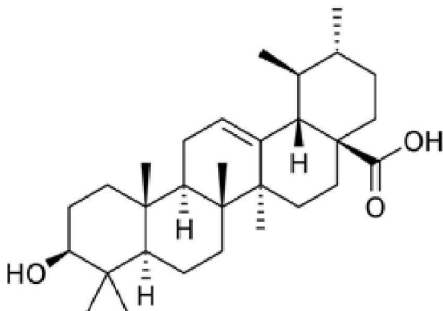
상기 화학식에서,

R₁은 H 또는 OH이고,

R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[화학식 2]



청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 식품 조성물은 건강 기능성 식품 조성물인 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

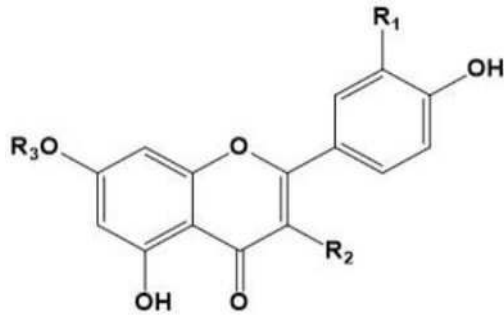
선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물.

청구항 14

하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜

(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물:

[화학식 1]



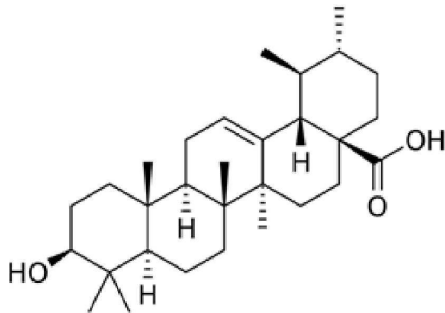
상기 화학식에서,

R₁은 H 또는 OH이고,

R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[화학식 2]



청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 의약품은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 및 연고제로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상인 것인 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자(Influenza)는 흔히 ‘독감’이라 알려져 있는 인플루엔자 바이러스(influenza virus)에 의해서 발병되는 급성 호흡기 질환으로, 전염성이 매우 강해 매년 전 세계적으로 크고 작은 집단감염이나 대유행을 일으키며, 유행이 시작되면 2~3주 이내에 통상 인구의 10~20%가 감염될 정도로 감염성이 큰 질병이다. 또한, 인플루엔자 바이러스는 고령자, 소아, 특정한 만성질환자, 면역부전 환자에게 심각한 호흡기 증상을 유발하여 심각한 경

우 사망에 이른다(Hien, T. T. et al. *N. Eng. J. Med.*, 350, 1179, 2004).

[0003] 인플루엔자 바이러스는 분류학적으로 오르쏘믹소바이러스(*Orthomyxovirus*)에 속하고, A, B, C형의 3가지 유형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A형, 및 B형으로 알려져 있다. 이들 바이러스 표면에는 당단백질인 적혈구 응집소(hemagglutinin, HA)와 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA)라는 두 종류의 표면 항원이 존재하고 내부에는 8개의 분절된 RNA가 존재한다. 헤마글루티닌은 인플루엔자 바이러스 표면에 돌어나 있는 항원성 돌기 중 하나이다. 이는 머리와 줄기로 구성된 트라이머(trimer) 형태이고, 이 중 머리 부분은 대부분의 항원변이와 관련되어 있으며 숙주세포의 표면에 있는 말단 시알산 잔기와 결합하여 바이러스를 부착시키고 순차적으로 바이러스가 숙주세포로 침투할 수 있게 한다(Chandrasekaran, A. et al. *Nature biotechnology*, 26, 107, 2008). 뉴라미니다아제는 바이러스 외피 막에 있는 당단백질의 효소이다. 이는 머리와 줄기 형태를 가지는 벚꽃모양의 테트라머(tetramer) 형태이고, 머리 상단 표면에 활성자리가 있다. 감염된 세포 내에서 복제 및 증식된 바이러스가 세포 표면의 올리고사카라이드 부분과 말단 뉴라민 산(neuraminic acid) 잔기를 연결해주는 알파-케토사이드본드(ketosidic bond)를 절단하여 바이러스를 숙주세포 밖으로 배출하여 호흡기 점막 세포로 침투하는 데 주요한 역할을 한다(a. Mark, V. I. *Nature review* 6, 987, 2007. b. Huberman, K et al. *Virology* 214, 294, 1995).

[0004] 바이러스의 표면 항원들은 동일한 아형에서 변이를 일으키고, 매년 새로운 항원 변이주가 출현한다. 특히, 인플루엔자 바이러스 중 최근까지 문제가 되는 조류 인플루엔자 바이러스는 대변이가 일어나 닭, 칠면조, 오리 및 야생조류 등 여러 종류의 조류를 감염시켰다. 닭이 감염되면 빠른 전파로 인해 80% 이상이 폐사하므로 전 세계적으로 양계산업에 가장 큰 피해와 위협이 될 뿐만 아니라 그 파급효과는 양계산업에만 한정되어 있지 않고 인체에 대한 감염으로 인하여 사람에게 질병을 일으키는 것으로 보고되어(Gubareva, L. V. et al. *Lancet*, 355, 2000), 이로 인해 피해가 막심하다.

[0005] 일반적으로 기침이나 재채기를 통해 공기 중으로 나오는, 바이러스가 함유된 연무질을 흡입함으로써 인플루엔자에 감염된다. 이 외에도 타 개체의 배설물, 침, 콧물, 대변과 혈액으로도 전염될 수 있지만, 대부분의 전염은 연무질 흡입으로 인한 비말감염이라고 할 수 있다. 가장 뚜렷한 증상은 감염 24시간 이내에 38~40℃의 갑작스러운 고열이며, 두통, 근육통 및 피로감 등의 전신 증상과 인후통, 기침, 객담 및 비염 등의 호흡기 증상도 나타난다. 또한 복통, 구토 및 경련 등이 드물게 발생할 수 있다. 건강한 사람은 수 일 동안 증상을 보인 후 회복되지만, 만성 폐 질환, 심장 질환자 및 면역 저하자 등은 폐렴과 같은 합병증이 발생하여 사망할 수 있으며, 이외에 뇌증, 척수염(transverse myelitis), Reye 증후군, 근염, 심근염 및 심낭염 등의 합병증이 동반될 수 있다. 소아의 경우 성인에서와 비슷한 증상을 보이지만, 열이 더 높게 나고, 열성 경련이 일어날 수 있으며, 중이염, 위막성 후두염(croup) 및 근육통도 더 흔하게 발생한다.

[0006] 종래 인플루엔자의 치료에 사용되는 약물로는 오셀타미비르(상품명: 타미플루), 자나미비르(상품명: 릴렌자), 페라미비르(en:Peramivir), 아만타딘(en:Amantadine) 등이 있다. 타미플루로 불리는 오셀타미비르가 현재 H1N1 인플루엔자 A형의 치료에 주로 사용되고 있다. 타미플루는 세계에서 유일하게 독점 생산하는 조류 인플루엔자(AI) 치료제이다. 바이러스를 증식시키는 효소 기능을 막아 치료 효과를 내는 항바이러스제이며, 증상이 발생한 뒤 48시간 안에 복용해야 효과가 크다. 주요 치료 효과는 독감 증세의 악화 감소, 기관지염이나 폐렴 등 2차 합병증 발생 감소, 독감 잠복 기간의 감소 등이다. 이는 인플루엔자 A와 B의 치료제로도 쓰인다. 자나미비르는 자나미비어(Zanamivir)로도 불리며 상품명은 릴렌자(Relenza)이다. 이는 뉴라미니다아제 저해제로 작용하여 인플루엔자 A 및 B형의 치료에 사용되고 있다. 그러나 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있으며, 자나미비르는 항바이러스 효과는 높지만, 생체 이용률이 낮고 신장에서의 배출이 빠르다는 단점이 있다.

[0007] 현재까지 개발된 항인플루엔자 치료제들은 부작용이 나타내는 경우가 대부분이다. 따라서, 인플루엔자의 예방 및 치료에 효과적인 항인플루엔자 조성물의 개발이 시급한 실정이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 선학초 추출물 및 오배자 추출물을 사용하여 인플루엔자 바이러스 감염증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) (대한민국 공개특허) 한국 등록특허 제10-1085401호

발명의 내용

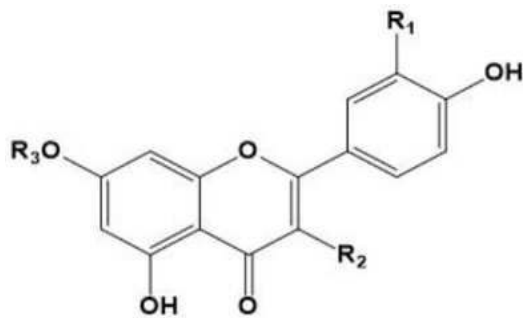
해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스 감염증의 치료를 위해서 연구한 결과 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물 및 이의 유래 화합물에 뛰어난 항인플루엔자 효과가 있는 것을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 이에 본 발명의 목적은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다:

[0014] [화학식 1]



[0015]

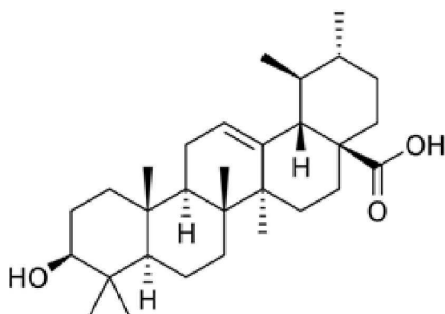
[0017] 상기 화학식에서,

[0018] R₁은 H 또는 OH이고,

[0019] R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

[0020] R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[0022] [화학식 2]



[0023]

[0025] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0026] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 30 내지 95% 에탄올을 사용하여 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

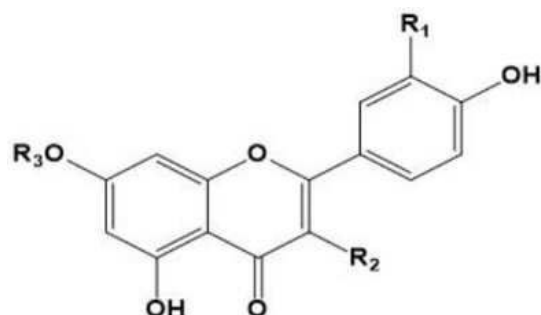
[0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 혼합물은 선학초 추출물 : 오배자 추출물의 중량비가 10:1 내지 1:10이 되도록 혼합될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A형 H1N1 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 혼합물은 인플루엔자 바이러스의 M1, 또는 NP 유전자의 발현을 억제시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물을 제공한다:

[0035] [화학식 1]



[0036]

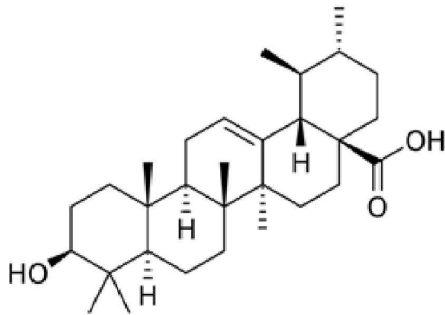
[0038] 상기 화학식에서,

[0039] R₁은 H 또는 OH이고,

[0040] R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

[0041] R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[0043] [화학적 2]



[0044]

[0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 플라보노이드(flavonoid) 화합물은 아프젤린(Afzelin), 아피제닌(Apigenin), 아피제닌 7-O-β-D-글루쿠로나이드(Apigenin 7-O-β-D-glucuronide), 아스트라갈린(Astragalin), 니코티플로린(Nicotiflorin), 케르세틴(Quercetin), 케르시트린(Quercitrin), 및 루틴(Rutin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 트리테르펜(triterpenoid) 화합물은 우르솔산(Ursolic acid)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0050] 또한, 본 발명은 상기 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체가 사용하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제방법을 제공한다.

[0051] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 상기 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0052] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 상기 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체가 사용하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제방법을 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료, 개선, 또는 억제 용도를 제공한다.

[0055] 또한, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료, 개선 또는 억제용 제제의 제조를 위한 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물의 용도를 제공한다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 상기 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료, 개선, 또는 억제 용도를 제공한다.

[0057] 또한, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료, 개선 또는 억제용 제제의 제조를 위한 상기 화학식 1

로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0058]

선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방, 치료 또는 개선용 조성물은 인체에 부작용이 없어 안전성이 우수하면서도, 바이러스 의존적인 경로를 통한 세포병변 효과, 인플루엔자 바이러스 관련 유전자 감소 효과 등에 따른 항바이러스 활성이 뛰어나다. 이에 더하여, 생체 내에서도 항바이러스 효과가 확인되었을 뿐만 아니라, 혼합 추출물의 활성 성분 역시 현저히 우수한 항바이러스 활성을 가진다는 점에서 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059]

도 1은 MDCK 세포주에서 APRG64의 세포독성을 시험한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2a 및 도 2b는 IAV 감염된 MDCK 세포주에서 APRG64의 세포병변 효과 억제 활성을 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 2c는 APRG64의 세포병변 효과 억제 활성이 바이러스 의존적 경로에 의한 것임을 나타내는 그래프이다.

도 3a는 APRG64 처리에 따른 인플루엔자 바이러스 M1 및 NP 유전자 발현 억제 효과를 나타낸 그래프 및 인플루엔자 바이러스 M1 및 NS1 단백질의 발현 억제 효과에 대한 웨스턴 블롯 실험 결과를 나타낸 사진이다.

도 3b는 APRG64의 처리에 따른 인플루엔자 바이러스 입자 감소 효과에 대한 플라크 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3c는 APRG64 처리에 따른 인플루엔자 바이러스의 NP를 발현하는 세포 감소 효과에 대한 면역세포화학 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 4는 APRG64에서 분리된 9가지의 화합물의 구조식을 나타낸 그림 및 작용기를 나타낸 도표이다.

도 5a 및 도 5b는 APRG64에서 분리된 9가지의 화합물 암 세포주에 처리 시 인플루엔자 바이러스의 M1 및 NP 유전자 발현 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6a 및 도 6b는 아피제닌에 의한 IAV 감염된 MDCK 세포주에서의 세포병변 효과 억제 활성을 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 6c는 아피제닌의 세포 병변 효과 억제 활성이 바이러스 의존적 경로임을 나타내는 그래프이다.

도 7a는 아피제닌 처리에 따른 인플루엔자 바이러스 M1 및 NP 유전자 발현 억제 효과를 나타낸 그래프 및 인플루엔자 바이러스 M1 및 NS1 단백질의 발현 억제 효과에 대한 웨스턴 블롯 실험 결과를 나타낸 사진이다.

도 7b는 아피제닌 처리에 따른 인플루엔자 바이러스 입자 감소 효과에 대한 플라크 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7c는 아피제닌 처리에 따른 인플루엔자 바이러스의 NP를 발현하는 세포 감소 효과에 대한 면역세포화학 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프이다.

도 8a는 아피제닌 처리에 따른 인플루엔자 바이러스 복제 억제 활성을 나타낸 웨스턴 블롯 실험 결과를 나타낸 사진이다.

도 8b 및 도 8c는 바이러스 복제의 초기 기전 타겟을 통한 APRG64 및 아피제닌의 인플루엔자 바이러스 복제 억제 활성을 확인한 실험에서 인플루엔자 바이러스의 M1 및 NP 유전자 발현 감소를 나타낸 그래프이다.

도 8d는 RNA 중합효소 활성 억제를 통한 APRG64 및 아피제닌의 인플루엔자 바이러스 복제 억제 활성을 확인한 실험결과를 나타낸 그래프이다.

도 8e는 MAPK 활성 억제를 통한 APRG64 및 아피제닌의 인플루엔자 바이러스 복제 억제 활성을 확인한 웨스턴 블롯 실험 결과를 나타낸 사진이다.

도 9a는 APRG64 및 아피제닌의 비강 투여 마우스 모델 모식도를 나타낸 그림이다.

도 9b는 APRG64 및 아피제닌의 비강 투여시, 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스 폐에서의 IAV 역가 감소 효과를 나타내는 그래프이다.

도 10a는 APRG64의 경구 투여 마우스 모델 모식도를 나타낸 그림이다.

도 10b는 APRG64 경구 투여시, 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스의 체중 감소 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 10c는 APRG64 경구 투여시, 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스의 사망 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 10d는 APRG64 경구 투여시, 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스 폐에서의 바이러스 RNA 및 감염성 바이러스 입자 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

도 10e는 APRG64 경구 투여시, 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스에서 유도된 IFN- γ , TNF- α 및 IL-6 발현 감소를 나타낸 그래프이다.

도 11a 내지 도 11c는 APRG64 유래 화학식 1 내지 3을 이용하여 분자도킹 시뮬레이션을 통한 인플루엔자 바이러스 억제 실험의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060]

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0062]

본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0063]

본 발명에 있어서, “선학초 추출물”은 선학초 잎, 줄기, 뿌리, 또는 이를 모두 포함한 식물 전체 추출물일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 선학초(*Agrimonia pilosa*) 잎 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 선학초는 직접 채취, 재배한 것 또는 시판되는 것 등을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0064]

본 발명에 있어서, “오배자 추출물”은 오배자 잎, 줄기, 가지, 뿌리, 또는 이를 모두 포함한 식물 전체 추출물일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 오배자(*Galla rhois*) 잎 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 오배자는 직접 채취, 재배한 것 또는 시판되는 것 등을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0065]

본 발명에 있어서, 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물은 APRG64로 약칭하였다.

[0066]

본 발명에 있어서, “추출물”은 상기 선학초 또는 상기 오배자의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다. 또한, “추출물”에는 조 추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성 용매 가용 추출물, 발효 추출물 등이 포함될 수 있다.

[0067]

또한, 상기 발효 추출물의 제조에 있어서 본 발명에 따른 선학초 또는 오배자 추출물의 인플루엔자 바이러스 억제 효과를 증진시키기 위하여 임의의 유산균 등이 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 건조물 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069]

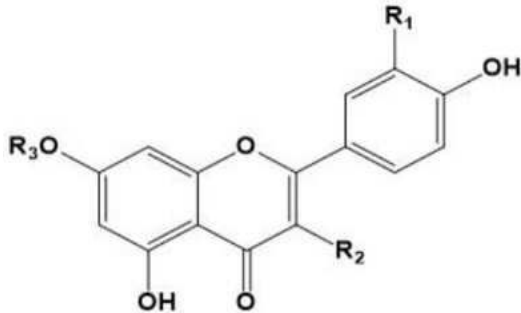
본 발명의 상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물에 있어서, 상기 선학초 또는 오배자를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 예를 들어, 초임계추출, 아임계추출, 고온추출, 고압 추출 또는 초음파추출법 등의 추출 장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등을 이용할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 가열추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다. 또한, 예를 들어 진탕 추출, 속슬렛(Soxhlet) 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 목적에 따라서 추출

물은 추가적으로 통상의 분획 공정을 수행할 수 있으며, 통상의 정제 방법에 따라 정제될 수 있다.

- [0070] 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기의 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가 과정을 통해 분말화하여 제조할 수 있다. 또 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography) 등의 다양한 크로마토그래피를 통해 추가적으로 정제 분획을 얻을 수 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분리 화합물, 분획 및 정제물, 이들의 희석, 농축, 건조물 등이 포함될 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 상기 선학초 또는 상기 오배자를 추출하는 데에 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 용매로서 정제수, 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 아이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 등을 포함하는 탄소 수 1 내지 4의 알코올 및 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로폼(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 사이클로헥세인(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 선학초 추출물 또는 상기 오배자 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 에탄올을 용매로 사용하여 추출할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 메탄올 또는 에탄올 수용액이 사용될 수 있으며, 상기 메탄올 또는 상기 에탄올 수용액은 30 내지 95%(v/v), 더욱 구체적으로 40 내지 60%(v/v), 가장 구체적으로 50%(v/v) 메탄올 또는 에탄올일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 에탄올을 용매로 사용하여 선학초 또는 상기 오배자를 추출할 경우, 예컨대 10 % 내지 100 % 에탄올, 10 % 내지 90 % 에탄올, 10 % 내지 80 % 에탄올, 10 % 내지 70 % 에탄올, 10 % 내지 60 % 에탄올, 10 % 내지 50 % 에탄올, 20 % 내지 90 % 에탄올, 20 % 내지 80 % 에탄올, 20 % 내지 70 % 에탄올, 20 % 내지 60 % 에탄올, 20 % 내지 50 % 에탄올, 30 % 내지 90 % 에탄올, 30 % 내지 80 % 에탄올, 30 % 내지 70 % 에탄올, 30 % 내지 60 % 에탄올, 30 % 내지 50 % 에탄올, 40 % 내지 90 % 에탄올, 40 % 내지 80 % 에탄올, 40 % 내지 70 % 에탄올, 40 % 내지 60 % 에탄올, 40 % 내지 50 % 에탄올, 45 % 내지 55 % 에탄올, 또는 50 % 에탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조공정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용할 수 있고, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조, 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 추출 횟수는 1회 이상 실시할 수 있으나, 추출이 계속될수록 활성 성분은 수득량이 현저히 감소되므로 5회 이상 반복 실시하는 것은 경제적이지 않을 수 있다. 이에, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 2 내지 5회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 상기 추출 용매를 건조된 선학초 또는 오배자 분량에 1 내지 30배, 1 내지 20배, 또는 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 추출 온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 80℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 추출 시간은 1 내지 10시간인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 혼합물은 선학초 추출물 : 오배자 추출물의 중량비가 10:1 내지 1:10이 되도록 혼합될 수 있으며, 또한, 중량비가 1:0.1 내지 9, 1:0.1 내지 8, 1:0.1 내지 7, 1:0.1 내지 6, 1:0.1 내지 5, 1:0.1 내지 4, 1:0.1 내지 3, 1:0.1 내지 2, 1:0.1 내지 1, 1:0.1 내지 0.9, 1:0.1 내지 0.8, 1:0.1 내지 0.7, 또는 1:0.1 내지 0.6이 되도록 혼합될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 6:4의 중량비로 혼합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 또한, 상기 혼합물은 인플루엔자 바이러스의 M1 또는 NP 유전자의 발현을 억제시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜

(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[화학식 1]



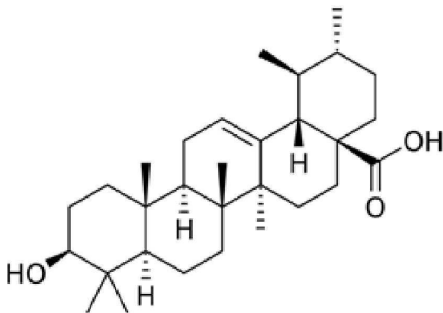
상기 화학식에서,

R₁은 H 또는 OH이고,

R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[화학식 2]



본 발명에서, 상기 플라보노이드(flavonoid) 화합물은 아프젤린(Afzelin), 아피제닌(Apigenin), 아피제닌 7-O-β-D-글루쿠로나이드(Apigenin 7-O-β-D-glucuronide), 아스트라갈린(Astragalin), 니코티플로린(Nicotiflorin), 케르세틴(Quercetin), 케르시트린(Quercitrin), 및 루틴(Rutin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서, 상기 트리테르펜(triterpenoid) 화합물은 우르솔산(Ursolic acid)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명에서, 화합물 10으로 표시되는 화합물은 분자식은 C₄₁H₃₂O₂₈, 분자량은 940.67일 수 있으며, [(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetrakis[(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy]oxan-2-yl)methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate의 IUPAC 네임을 가질 수 있다.

본 발명에서, 화합물 2로 표시되는 화합물은 분자식은 C₃₀H₄₈O₃, 분자량은 456.7일 수 있으며,

(1S,2R,4aS,6aR,6aR,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydro-1H-picene-4a-carboxylic acid의 IUPAC 네임을 가질 수 있다.

[0097] 본 발명에서, 화합물 3으로 표시되는 화합물은 분자식은 $C_{15}H_{10}O_7$, 분자량은 302.2일 수 있으며, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one의 IUPAC 네임을 가질 수 있다.

[0098] 또한, 상기 화합물의 획득 방법은 본 발명이 속한 분야에서 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 추출물 또는 혼합물에 유효성분, 표준물질 또는 활성물질로 화합물 1 내지 10으로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 추출물 또는 혼합물은 상기 화합물을 고용량 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0100] 본 발명에서 용어, “인플루엔자(influenza)”는 감기 증세를 일으키는 바이러스 중 오소믹소바이러스과의 인플루엔자 바이러스가 유발하는 감염성 질환을 일컫는다. 일반 감기에 비해 발열, 근육통, 두통 등의 전신적인 증상이 뚜렷하게 나타나며 잠복기는 1~3일 정도이다. 인플루엔자는 A, B, C형으로 구분되며 이들의 전체적 구조 및 조성이 동일하며, 직경 80~120nm의 크기로 감염 초기에는 필라멘트 모양이지만, 후기에는 원형이 된다. 인플루엔자 바이러스는 중앙의 핵을 둘러싸고 있는 바이러스성 외피는 크게 헤마글루티닌(H)과 뉴라미니다아제(N) 두 종류로 구별할 수 있는 당단백질로 구성되어있으며, 핵은 바이러스성 RNA(viral RNA)와 이를 보호하고 활성화하는데 필요한 바이러스성 단백질(viral protein)을 포함한다. B형과 C형의 경우 감수성이 낮고 유전학적 다양성이 떨어져 아형이 거의 존재하지 않으며, 적은 빈도로 출현하여 유행이 잘 일어나지 않는 반면, A형은 헤마글루티닌과 뉴라미니다아제에 대한 항체의 반응 여부에 따라 다시 여러 개의 아형으로 나뉘지며, 자연계에는 H형 18개, N형 11개 존재하며 주로 H1N2/3 및 N1/2가 인간에게 독감을 일으키는 아형이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A형 H1N1 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0101] 본 발명에서 사용된 용어 “분자 도킹 시뮬레이션”이란 단백질, 펩타이드, 핵산, 탄수화물, 지질과 같은 생물학적으로 관련된 분자간의 연관성을 토대로 적절한 표적 결합부위에 대한 소분자 리간드의 결합 적합성을 예측하여, 구조 기반 약물설계에서 많이 사용되는 방법으로 본 발명에선 인플루엔자 바이러스 단백질과의 결합능을 바탕으로 인플루엔자 저해 활성여부를 판단하였다.

[0102] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0103] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0104] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0105] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0106] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴,

아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메틸셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메틸셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리코유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제가 사용될 수 있다.

[0107] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0108] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0109] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0110] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

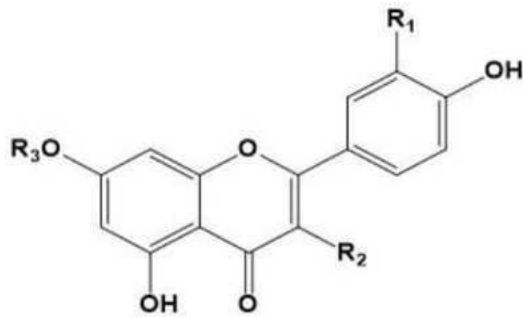
[0111] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스틴산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정팅산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이트 0.1%, 소듐포름알데히드 셀폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0112] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용

될 수 있다.

- [0113] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0114] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0115] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0116] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0117] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0119] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0120] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0122] 본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0123] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다:

[0125] [화학식 1]



[0126]

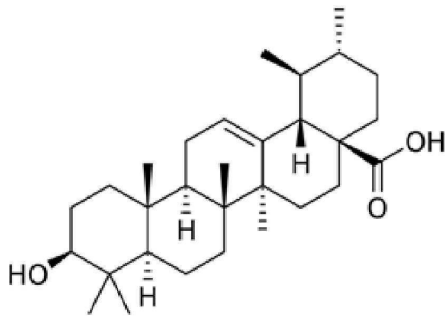
[0128] 상기 화학식에서,

[0129] R₁은 H 또는 OH이고,

[0130] R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

[0131] R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[0133] [화학식 2]



[0134]

[0136] 본 발명에 있어서, “식품”이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능성 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.

[0137] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0138] 본 발명에 있어서, 상기 “건강기능성 식품(functional food)”이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하며, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 분말, 액제, 편상(flake), 페이스트, 시럽제, 젤, 젤리, 바(bar), 또는 필름 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0139] 본 발명의 선향초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물 및 이의 유래 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 담팔수 추출물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0140] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

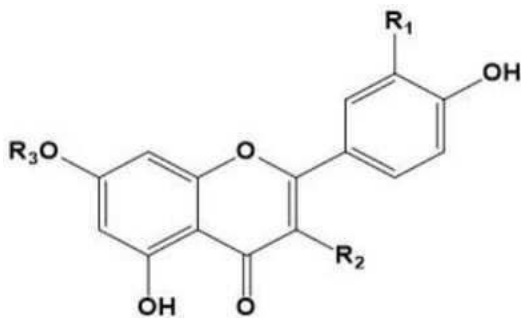
[0141] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 텍스트린 및 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.

[0142] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0143] 또한, 본 발명은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물과 오배자(*Galla rhois*) 추출물의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물을 제공한다.

[0144] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 플라보노이드(flavonoid) 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 트리테르펜(triterpenoid) 화합물, 이들의 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0146] [화학식 1]



[0147]

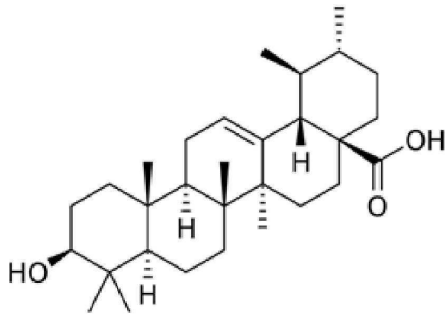
[0149] 상기 화학식에서,

[0150] R₁은 H 또는 OH이고,

[0151] R₂는 α-L-rhamnopyranosyl, H, β-D-glucopyranosyl, rutinosyl, 및 OH로 이루어진 군으로 선택되는 어느 하나이고,

[0152] R₃은 H 또는 β-D-glucuronosyl이고,

[0154] [화학식 2]



[0155]

[0157]

본 발명에 따른 “인플루엔자 바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약품 조성물”에 있어서, 의약품은 약사법 제2조 제7호 다목에 기재된 감염병 예방을 위하여 살균·살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제로서, 사람 또는 동물의 보건을 위해 사용되는 파리, 모기 등의 기피제, 구제제, 방지제, 방제제 또는 유인살충제를 의미할 수 있다.

[0158]

또한, 상기 의약품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0159]

본 발명에 따른 상기 의약품 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0160]

본 발명의 의약품 조성물은 일 예로, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조된 것일 수 있다. 예를 들어, 로션 등과 같은 유액, 크림, 연고, 스프레이, 오일젤, 젤, 오일, 에어로졸, 연막제와 같은 제형을 가질 수 있으나, 본 발명의 해충 방제 유도 효과를 나타내는 것이라면 제한되지 않고 사용할 수 있다. 또한 상기 의약품 조성물은 각각의 제형에 일반적으로 의약품 조성물에 배합되는 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 또는 향료 등을 필요에 따라 적절히 배합하여 사용할 수 있다.

[0161]

본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0163]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0165]

실시예 1. 세포배양

[0166]

실험에 사용된 MDCK 세포주는 37℃, 5% CO₂의 조건으로 10% 소 태아 혈청(FBS, Hyclone Thermo Scientific) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S, Gibco)이 포함된 MEM(Minimum essential medium, Gibco) 배지에서 배양하였다.

[0168]

실시예 2. 추출물의 제조

[0169]

선학초(*Agrimonia pilosa*)와 오배자(*Galla rhois*)의 잎은 BioKorea Co., LTd(Seoul)에서 구입하고, 바우처 표본(BMRI-AP-1601, BMRI-RG-1602)은 한국 용인 경희대학교 바이오메디컬연구센터에 기탁하였다. 건조된 샘플(20kg)을 80±2℃에서 6시간 동안 50% 에탄올로 추출한 다음 여과하였다. 그 후, 회전 증발기를 사용하여 농축시키고 동결 건조하여 선학초 추출물 1.57kg 및 오배자 추출물 11.59kg을 얻었다. 선학초 추출물과 오배자 추출물의 혼합물은 각각 6:4의 비율로 혼합하여 사용하였으며, APRG64로 약칭하였다. 모든 샘플은 사용 전까지 4℃

에서 보관하였다.

[0171] **실험예 1. IAV 유도 세포병변 효과에 대한 APRG64의 억제 활성 확인**

[0172] IAV에 대한 항바이러스 활성을 조사하기 위하여 CPE(세포병변 효과, cytopathic effect) 분석을 실시하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 감염 다중도(MOI)에서 1시간 동안 IAV(A/California/07/2009)에 감염시킨 후, 37℃, CO₂ 조건의 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. APRG64를 농도별(0, 2.5, 5, 및 10μg/ml)로 24시간 동안 처리한 후, 세포독성 및 CPE에 대한 효과를 확인하였다. 이 때, 부착된 세포의 백분율을 분석하기 위해 세포를 1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하여 세포의 형태학적 변화 여부를 관찰하고, 부착된 세포의 백분율을 그래프로 나타내었다.

[0174] 실험예 1-1. APRG64의 세포 독성의 확인

[0175] 그 결과, 전 구간의 농도에 대하여 APRG64는 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다(도 1).

[0177] 실험예 1-2. APRG64의 IAV 유도 CPE 억제 활성 확인

[0178] 그 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이 APRG64 무처리 시 MDCK 세포에서 강력한 CPE가 관찰되었지만, APRG64 처리한 경우에는 용량 의존적 방식으로 IAV 유도 CPE를 유의하게 억제하는 것으로 확인되었으며, 이때의 50% 유효 농도(EC₅₀)는 6.274μg/ml로 확인되었다.

[0180] 실험예 1-3. APRG64의 바이러스 의존적 경로를 통한 항바이러스 효과 확인

[0181] 실험예 1-2에서 확인된 APRG64의 IAV 유도 CPE 억제 활성이 바이러스 비의존적 세포 사멸이 아닌 바이러스 의존적 세포 사멸 효과임을 명확히 하기 위하여 세포사멸사 유도제 하에서도 동일한 효과가 나타나는지를 확인하였다. 구체적으로, IAV에 감염된 MDCK 세포에 세포사멸사 유도제인 스타우로스포린(staurosporine, STS)을 200nM 처리한 후 10μg/ml APRG64를 추가적으로 처리하여 세포 사멸 여부(세포 생존율)를 확인하였다. 이 때 1% 크리스탈 바이올렛 염색을 사용하였고, ImageJ 소프트웨어로 이미지를 처리하여 플레이트에 부착된 세포를 정량화하였으며, 모든 그래프는 3회 반복의 평균을 기반으로 제작되었다.

[0183] 그 결과, 실험예 1-2의 결과와는 달리 APRG64 추가군은 STS 유도 세포 사멸을 예방하지 못했다는 점에서(도 2c), APRG64가 바이러스 의존적인 경로를 통해 IAV 감염으로부터 유도된 CPE를 억제하여 MDCK 세포를 보호하는 것이 명확히 확인되었다.

[0185] **실험예 2. APRG64의 IAV 복제 억제에 따른 항바이러스 효과 확인**

[0186] 실험예 2-1. APRG64의 IAV 복제 억제 활성 확인

[0187] 실험예 1에서 확인된 APRG64의 IAV 유도 CPE 억제 활성 효과가 바이러스 복제 억제에 기반한 것인지 여부를 확인하였다. 이를 확인하기 위하여 IAV에 감염된 MDCK 세포에 APRG64로 처리한 후 인플루엔자 바이러스 mRNA, 단백질 및 감염 입자의 생산에 대해 RT-qPCR 및 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다.

[0189] 먼저, MEM배지에서 배양된 MDCK 세포를 0.1의 감염 다중도(MOI)에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 APRG64(10μg/ml)로 처리하였고, 6시간 후, 인플루엔자 바이러스의 구조를 형성하는 M1 및 바이러스 핵단백질(Nucleoprotein, NP)의 발현 수준을 RT-qPCR로 분석하였다. 이 때, 세포에서 총 RNA를 추출하기 위해 제조업체의 지침에 따라 NucleoZOL(Macherey-Nagel, Duren, Germany)을 사용하였고, 나노그램의 RNA를 사용하여 ReverTraAce qPCR RT 키트(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 분리된 RNA는 Nanodrop을 통해 정량한 후 cDNA 합성 키트(RevertraAce qPCR RT kit, Toyobo)를 이용해 cDNA로 합성하였으며, CFX Connect

real-time system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해 real-time PCR를 실시하였다. 프라이머 반응 조건은 95℃에서 10분 동안 전보온 시켰으며, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분으로 총 40 cycle을 반복하였다.

표 1

[0191]

구분(내용)	방향	서열
서열번호 1(M1 primer)	forward	5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTG-3'
서열번호 2(M1 primer)	reverse	5'-CAAAACGCTACGCTGCAGTCC-3'
서열번호 3(NP primer)	forward	5'-CCAGATCAGTGTGCAGCCTA-3'
서열번호 4(NP primer)	reverse	5'-CTCTGGCTTGCACCTTCC-3'
서열번호 5(GAPDH primer)	forward	5'-AACATCATCCCTGCTTCCAC-3'
서열번호 6(GAPDH primer)	reverse	5'-GACCACCTGGTCCTCAGTGT-3'

[0193]

또한, IAV의 M1 및 NS1 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하였으며, 액틴은 로딩 컨트롤로 사용되었다. 구체적으로, 프로테아제 억제제(Thermo Scientific)의 존재하에 NP-40 완충액(ELPIS Biotech, 대전, 한국)을 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포 추출물을 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 겔에 로딩한 다음 니트로셀룰로오스 멤브레인(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)으로 옮긴 후, 차단을 위해 멤브레인을 TBST 용액에서 2% BSA와 함께 1시간 동안 인큐베이션한 다음 4℃에서 밤새 1차 항체(Abcam, Cambridge, UK)와 함께 인큐베이션하였다. 세포막은 실온에서 1시간 동안 호스라디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 접합된 2차 항체로 배양되었으며, Super Signal West Pico PLUS 화학발광기질(Thermo Scientific)을 사용하여 얼룩진 단백질을 검출하였다.

[0195]

그 결과, APRG64 처리는 IAV M1(도 3a, 왼쪽 그래프) 및 NP(도 3a, 중앙 그래프) mRNA의 발현을 강력하게 억제하는 것으로 나타났고, 이러한 결과와 일치하게, M1 및 비구조 단백질 1(NS1)을 포함한 바이러스 단백질의 발현은 APRG64 처리에 의해 실질적으로 억제되는 것으로 확인되었다(도 3a, 오른쪽 사진).

[0197]

실험예 2-2. APRG64에 의한 IAV 감염성 바이러스 입자 감소 효과 확인

[0198]

APRG64에 의한 IAV 감염성 바이러스 입자 감소 효과를 확인하기 위하여 플라크 분석을 통해 감염성 바이러스 입자를 적정하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 10 μ g/ml의 APRG64를 36시간 동안 처리한 후, 0.3% BSA 및 0.5% 아가로스(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)를 함유하는 MEM으로 2일 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 3.5% 포름알데히드로 고정하고 아가로스 겔에서 제거하였고, 플라크는 1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 세포를 염색하여 확인하였다.

[0200]

그 결과, APRG64 처리는 감염성 바이러스 입자의 생성을 유의하게 감소시키는 것으로 확인되었으며, 이는 실험예 3-1의 결과와 일치하는 것이다(도 3b).

[0202]

실험예 2-3. APRG64에 의한 IAV NP 발현 세포의 감소 효과 확인

[0203]

APRG64에 의한 IAV NP 발현 세포의 감소 효과를 확인하기 위하여 면역세포화학 분석을 수행하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 6시간 동안 10 μ g/ml의 APRG64를 처리하였고, 4% 포름알데히드로 고정한 후 0.5% Triton X-100(Sigma-Aldrich)으로 투과화시켰다. 항-IAV NP 항체(Abcam)로 처리한 후, 세포를 Alexa Fluor 488-접합 이차 항체(Thermo Scientific)와 함께 인큐베이션하였으며, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액(Sigma-Aldrich)을 사용하여 핵을 검출하였다. 세포 이미지는 N-SIM S Super Resolution Microscope(Nikon, Tokyo, Japan)로 캡처하고 N-SIM 이미지 획득 소프트웨어 브라우저(Nikon)로 분

석하였다. 이에 따라, 바이러스성 NP 단백질(녹색)과 핵(DAPI⁺, 파란색)은 면역세포화학 분석에 의해 시각화되었으며, 대표적인 이미지(왼쪽 패널) 및 DAPI⁺ 세포에 대한 NP⁺ 세포의 백분율이 표시되었다. 모든 그래프는 3회 반복의 평균을 나타낸다.

[0205] 그 결과, IAV NP-발현 세포의 수는 APRG64에 의해 유의하게 감소되는 것으로 나타났고(도 3c), 이에 따르면 APRG64가 강력한 항-IAV 활성을 가진다는 것이 강력하게 뒷받침되었다.

[0207] 실시예 3. APRG64의 항바이러스 성분 식별

[0208] 실험예 1 및 2에 따른 APRG64의 항바이러스 효과를 나타내는 구체적인 성분을 확인하기 위하여 활성 성분 분리 실험을 수행하였다. 먼저, 농축 추출물(APRG64)을 EtOAc, n-BuOH 및 H₂O 분획으로 분할하였다. TLC 플레이트에서 주요 플라보노이드 반점이 관찰되었기 때문에 EtOAc 분획(APRG64-E)을 사용하여 활성 대사산물을 분리하였으며, c.c.로 구분된 분수 SiO₂, ODS 및 Sephadex LH-20을 사용하여 8개의 플라보노이드(flavonoids)(1-8)와 1개의 트리테르페노이드(triterpenoid)(9)를 생성하였다(표 2 및 도 4).

[0209] 구체적으로, 실시예 2에서 제조된 APRG64 추출물(2kg)을 H₂O(1.5L)에 현탁시킨 후 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EtOAc, 1.5L×3) 및 n-부탄올(n-BuOH, 1.5L×3)로 순차적으로 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여 EtOAc(APRG64-E, 178g), n-BuOH(APRG64-B, 328g) 및 H₂O(APRG64-W, 494g) 분획을 얻었다.

[0210] APRG64-E 분획(178g)에 SiO₂ c.c.(φ 12×20cm) 및 클로로포름-메탄올(CHCl₃-MeOH, 30:1→20:1→10:1→3:1; 각각 18L)로 용출하여 25개의 분획(APRG64-E-1~APRG64-E-13)이 생성되었다.

[0211] 분획 APRG64-E-13[609.2mg, 용리 부피/총 부피(Ve/Vt) 0.224-0.230]을 ODS c.c.(φ 3.5×5.0cm) 및 아세톤-H₂O(1:1→3:1; 둘 다 10L)로 용리하여 17개의 분획(APRG64-E-13-1~APRG64-E-13-17)이 생성되었다.

[0212] 분획 APRG64-E-13-14(150.9mg, Ve/Vt=0.315-0.444)을 ODS c.c.(φ 2.5×5.0cm) 및 MeOH-H₂O (3:1; 6L)로 용출하여 궁극적으로 12개의 분획(APRG64-E-13-14-1~APRG64-E-13-14-12)이 생성되었고, 상기 12개의 분획에는 정제된 화합물 2[아피게닌, APRG64-E-13-14-7, 10.7mg, Ve/Vt 0.306-0.456, TLC(SiO₂ F254) 머무름 계수(retention factor, Rf) 0.46, CHCl₃-MeOH = 20:1] 및 화합물 9[우르솔릭 산, APRG64-E-13-14-10, 44.4mg, Ve/Vt 0.621-0.765, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.56, CHCl₃-MeOH = 20:1]가 포함되었다.

[0213] 분획 APRG64-E-23[7.9g, Ve/Vt 0.683-0.720]을 ODS c.c.(φ 7.0×7.0cm) 및 아세톤-H₂O(1:3→1:2; 둘 다 30L)로 용리하여 12개의 분획(APRG64-E-23-1 to APRG64-E-23-12)이 생성되었고, 상기 12개의 분획에는 정제된 화합물 7[퀘르시트린, APRG64-E-23-5, 684.5mg, Ve/Vt 0.423-0.660, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.70, CHCl₃-MeOH = 2:1]이 포함되었다.

[0214] 분획 APRG64-E-23-3(648.3mg, Ve/Vt=0.015-0.023)을 ODS c.c.(φ 3.0×5.0cm) 및 MeOH-H₂O(1:2; 8L)로 용출하여 궁극적으로 11개의 분획(APRG64-E-23-3-1~APRG64-E-23-3-11)이 생성되었고, 상기 11개의 분획에는 정제된 화합물 6[퀘르세틴, APRG64-E-23-3-9, 24.1mg, Ve/Vt 0.756-0.795, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.42, CHCl₃-MeOH = 20:1]이 포함되었다.

[0215] 분획 APRG64-E-23-6(258.3mg, Ve/Vt=0.111-0.153)에 SiO₂ c.c.(φ 3.0×15cm) 및 CHCl₃-MeOH-H₂O(20:3:1→10:3:1; 둘 다 6L)로 용리하여 17개의 분획(APRG64-E-23-6-1~APRG64-E-23-6-17)이 생성되었다.

[0216] 분획 APRG64-E-23-6-3(81.4mg, Ve/Vt=0.078-0.140)을 ODS c.c.(φ 1.5×8.0cm) 및 MeOH-H₂O(2:3; 2L)로 용리하여 궁극적으로 8개의 분획(APRG64-E-23-6-3-1~APRG64-E-23-6-3-8)이 생성되었고, 상기 8개의 분획에는 정제된 화합물 1[afzelin, APRG64-E-23-6-3-6, 6.7mg, Ve/Vt 0.538-0.629, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.54, CHCl₃-MeOH=20:1]이 포함되었다.

[0217] 분획 APRG64-E-23-6-3-4(31.8mg, Ve/Vt=0.156-0.241)에 Sephadex LH-20 c.c.(φ 1.5×50cm) 및 100%

MeOH(1.5L)로 용리하여 궁극적으로 6개의 분획(APRG64-E-23-6-3-4-1~APRG64-E-23-6-3-4-6)이 생성되었고, 상기 6개의 분획에는 정제된 화합물 4[아스트라갈린, APRG64-E-23-6-3-4-2, 26.5mg, Ve/Vt 0.502-0.742, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.50, CHCl₃-MeOH-H₂O=7:3:1]가 포함되었다.

[0218]

분획 APRG64-E-23-8(2.4g, Ve/Vt=0.253-0.423)에 SiO₂ c.c.(ϕ 4.0×15cm) CHCl₃-MeOH-H₂O(20:3:1→10:3:1→7:3:1→6:4:1; 각각 6L)로 용출하여 최종적으로 24개의 분획(APRG64-E-23-8-1~APRG64-E-23-8-24)이 생성되었고, 상기 24개의 분획에는 정제된 화합물 3[아피제닌 7-O-β-D-글루쿠로나이드, APRG64-E-23-8-3, 175.3mg, Ve/Vt 0.056-0.209, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.52, CHCl₃-MeOH-H₂O=12:3:1], 화합물 5[니코티플로린, APRG64-E-23-8-5, 22.9mg, Ve/Vt 239 0.377-0.501, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.34, CHCl₃-MeOH-H₂O=12:3:1], 및 화합물 8[루틴, APRG64-E-23-8-16, 7.9mg, Ve/Vt 0.760- 0.809, TLC(SiO₂ F254) Rf 0.61, CH₂Cl₃-MeOH-H₂O = 6:4:1]이 포함되었다.

표 2

[0220]

구분	이름	특징
화합물 1	아프젤린 (Afzelin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 433 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,400, 1,660, 1,605 및 1,500cm ⁻¹
화합물 2	아피제닌 (Apigenin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 271 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,420, 2,935, 1,645 및 1,605cm ⁻¹
화합물 3	아피제닌 7-O-β-D-글루쿠로나이드 (Apigenin 7-O-β-D-glucuronide)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 469 [M+Na] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,455, 1,645, 1,510 및 1,365cm ⁻¹
화합물 4	아스트라갈린 (Astragalinalin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 471 [M+Na] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,350, 2,930, 2,365, 1,655 및 1,610cm ⁻¹
화합물 5	니코티플로린 (Nicotiflorin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 639 [M+Na] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,365, 2,940, 2,360, 1,655, 1,600 및 1,515cm ⁻¹
화합물 6	케르세틴 (Quercetin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 303 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,350, 1,680 및 1,615cm ⁻¹
화합물 7	케르시트린 (Quercitrin)	황색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 449 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,358, 1,659, 1,610 및 1,500cm ⁻¹
화합물 8	루틴 (Rutin)	황색 비정질 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 611 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3405, 3,930, 1,660 및 1,565cm ⁻¹
화합물 9	우르솔산 (Ursolic acid)	백색 무정형 분말(MeOH); 양성 FAB/MS m/z 457 [M+H] ⁺ ; IR(KBr, v) 3,400, 1,732 및 1,680cm ⁻¹

[0222]

실험예 3. APRG64으로부터 분리된 9가지 화합물의 항바이러스 활성 확인

[0223]

실시에 3에 따라 APRG64에서 분리된 9가지의 성분 중 항바이러스 효과를 나타내는 성분을 식별하기 위하여 항 IAV 활성을 확인하였다. 항 IAV 활성은 실험예 2와 동일하게 IAV로 감염된 세포에 각 화합물을 처리한 후 인플루엔자 바이러스의 구조를 형성하는 M1 및 바이러스 핵단백질(Nucleoprotein, NP)의 발현양을 통해 확인하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 후, 아프젤린(화합물 1, 10μg/ml), 아피제

닌(화합물 2, $5\mu\text{g}/\text{ml}$), 아피제닌 7-O-글루쿠로나이드(화합물 3, $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 아스트라갈린(화합물 4, $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 니코티플로린(화합물 5, $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 케르세틴(화합물 6, $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$), 케르시트린(화합물 7, $10\mu\text{g}/\text{ml}$), 루틴(화합물 8, $5\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 우르솔산(화합물 9, $10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각각 처리한 후 IAV의 M1 및 NP mRNA의 상대적인 발현 수준을 RT-qPCR로 분석하였다. 각 화합물의 농도를 제외하고는 실시예 2-1과 동일한 방법으로 RT-qPCR 분석을 실시하였다.

[0225] 그 결과, 9개의 화합물 중 루틴(화합물 8)을 제외한 8개(아프젤린, 아피제닌, 아피제닌 7-O-글루쿠로나이드, 아스트라갈린, 니코티플로린, 케르세틴, 케르시트린 및 우르솔산)의 화합물이 IAV의 M1 및 NP mRNA 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 확인되었으며(각각 도 5a 및 도 5b), 특히, 아피제닌(화합물 2)의 항-IAV 활성이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0227] 실험예 4. IAV 유도 CPE에 대한 아피제닌의 우수한 억제 활성 확인

[0228] 실험예 3에서 가장 항바이러스 효과가 우수한 것으로 확인된 아피제닌(화합물 2)의 항바이러스 효과를 추가적으로 확인하기 위하여, IAV에 의해 유도된 CPE 억제 활성 및 바이러스 의존적 경로를 통한 항바이러스 효과인지를 여부를 분석하였다.

[0230] 실험예 4-1. 아피제닌의 우수한 IAV 유도 CPE 억제 활성 효과확인

[0231] CPE 억제 활성을 확인하기 위하여, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 IAV로 감염시킨 다음, 0.625, 1.25, 2.50 또는 $5.00\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아피제닌을 처리하였고, 24시간 후, 세포를 1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하여 부착된 세포를 분석하였다. 또한, 24 hpi에서 부착된 세포를 정량화하여 아피제닌의 EC_{50} 을 계산하였으며, 이 외에는 실험예 1-2과 동일한 방법으로 CPE 분석을 실시하였다.

[0233] 그 결과, IAV에 의해 유발된 CPE가 아피제닌의 용량 의존적으로 현저히 감소하는 것으로 확인되었고(도 6a), 이때 EC_{50} 은 $1.438\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었으며(도 6b), 이와 같은 결과는 실험예 1-2와 상응하는 것이다.

[0235] 실험예 4-2. 아피제닌의 바이러스 의존적 경로를 통한 항바이러스 효과 확인

[0236] 실험예 4-1에 따른 CPE 억제 활성이 바이러스 의존적 경로에 기반한 것인지 확인하기 위하여 세포사멸사 유도제 처리 후 아피제닌을 추가적으로 처리하여 세포 사멸 여부를 확인하였다. 구체적으로, MDCK 세포에 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아피제닌을 처리한 다음 200nM의 스타우로스포린(STS)을 추가적으로 처리하여 CPE 분석을 수행하여 세포 생존력을 확인하였다. 이 때, ImageJ 소프트웨어로 이미지를 처리하여 플레이트에 부착된 세포를 정량화하였으며, 그래프는 3회 반복의 평균을 나타내었으며, 이 외에는 실험예 1-3과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0238] 그 결과, 아피제닌을 처리하였음에도 불구하고 STS에 의한 바이러스 감염-독립적 세포사멸로부터 세포를 보호하지 못하는 것으로 확인되었고(도 6c), 이는 실험예 1-3에서 APRG64 추가군은 STS 유도 세포 사멸을 예방하지 못하였다는 결과와 일치하는 것이다(도 2c).

[0240] 실험예 5. 아피제닌의 IAV 복제 억제에 따른 우수한 항바이러스 효과 확인

[0241] 실험예 5-1. 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성 확인

[0242] 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성을 확인하기 위하여 RT-qPCR 분석 및 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아피제닌을 처리하였고, 6시간 후, IAV의 M1 및 NP mRNA의 발현 수준을 RT-qPCR로 분석하였고, 바이러스 M1 및 NS1 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 실험 방법 및 조건은 실험예 2-1과 동일하게 수행하였다.

- [0244] 그 결과, 아피제닌 처리는 IAV의 M1 및 NP mRNA(도 7a, 왼쪽 및 중앙 그래프) 및 단백질(도 7a, 오른쪽 사진)의 발현을 크게 감소시키는 것으로 확인되었고, 이는 실험예 2-1에서 확인된 APRG64의 IAV 복제 억제 활성과 일치하는 것이다.
- [0246] 실험예 5-2. 아피제닌에 의한 IAV 감염성 바이러스 입자 감소 효과 확인
- [0247] MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 5 μ g/ml의 아피제닌을 처리하였고, 36 hpi에서 플라크 분석을 수행하여 감염성 바이러스 역가를 측정하여 그래프로 나타내었다. 이 때, 플라크 분석 방법 및 조건은 실험예 2-2와 동일하게 수행하였다.
- [0249] 그 결과, 아피제닌 처리에 의해 감염성 바이러스 입자의 생성이 현저히 감소되는 것으로 확인되었으며(도 7b), 이는 실험예 2-2에서 확인된 APRG64의 IAV 바이러스 입자 감소 효과와 일치한다.
- [0251] 실험예 5-3. 아피제닌에 의한 IAV NP 발현 세포의 감소 효과 확인
- [0252] 아피제닌에 의한 IAV의 NP를 발현하는 세포(IAV-NP) 증감 여부를 확인하기 위하여 면역세포화학 분석을 실시하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1의 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 6시간 동안 5 μ g/ml의 아피제닌을 처리한 후, IAV-NP 발현 세포의 감소 여부를 면역세포화학 분석으로 확인하였으며, 이 때, 면역세포화학 분석은 실험예 2-3와 동일하게 수행하였다.
- [0254] 그 결과, 아피제닌을 처리한 경우 IAV NP 세포가 거의 검출되지 않아(도 7c) 강력한 항바이러스 활성이 확인되었으며, 이는 실험예 2-3에서 확인된 APRG64의 IAV 바이러스 입자 감소 효과와 일치하는 것이다.
- [0256] 이와 같은 결과를 통하여 아피제닌이 APRG64의 주요 항바이러스 성분임이 확인되었다.
- [0258] **실험예 6. APRG64 및 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성**
- [0259] 실험예 6-1. 다른 IAV 균주에 대한 APRG64 및 아피제닌의 항바이러스 활성 확인
- [0260] APRG64와 아피제닌이 IAV의 다른 균주에 대해서도 항바이러스 활성을 갖는지 여부를 조사하였다. 이를 위해 MDCK 세포를 다른 인플루엔자 균주인 A/PR/8/34(H1N1)에 0.1의 MOI에서 1시간 동안 감염시키고 APRG64(10 μ g/ml) 또는 아피제닌(5 μ g/ml)을 각각 처리하였다. 6시간 후, IAV의 M1 및 NP 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 분석하였으며, 웨스턴 블롯 분석은 실험예 2-1과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0262] 그 결과, 인플루엔자 A/California/07/2009 균주에 대한 항바이러스 효과와 유사하게, APRG64 및 아피제닌은 각각 PR8-감염 세포에서 바이러스 단백질 발현을 강하게 감소시키는 것으로 확인되었다(도 8a). 특히, APRG64 및 아피제닌의 항-IAV 활성이 IAV 감염 치료를 위해 임상적으로 사용되는 항바이러스성 뉴라미니다제 억제제(neuraminidase inhibitor)인 oseltamivir phosphate (Tamiflu)와 유사하게 나타났다는 점에서, 인플루엔자 바이러스 치료 효과가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.
- [0264] 실험예 6-2. 바이러스 복제 초기 단계 억제에 따른 APRG64 및 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성 확인
- [0265] IAV 복제는 바이러스가 숙주 세포에 부착하여 세포 내로 유입하는 것으로 시작되는데, APRG64 및 아피제닌이 이러한 바이러스 복제의 초기 단계를 타겟하여 IAV 복제 억제 활성을 나타내는지 여부를 분석하였다. 먼저, 각 물질의 바이러스 부착에 대한 효과를 확인하기 위하여 MDCK 세포를 4℃에서 1시간 동안 10 μ g/ml의 APRG64 또는 5

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아피제닌을 각각 처리하여 0.1의 MOI에서 IAV로 감염시켰다. 그 후, IAV의 M1 및 NP의 mRNA 발현 수준을 6 hpi에서 RT-qPCR에 의해 분석하였다. 또한, 감염 후 1, 2 또는 4시간(hpi)에서 APRG64 또는 아피제닌으로 처리한 후의 IAV의 M1 및 NP의 mRNA 발현 수준을 분석하였다.

[0267] 그 결과, APRG64와 아피제닌은 IAV의 M1 및 NP RNA의 발현을 각각 유의하게 억제시켰다(도 8b). 또한, 감염 후 1, 2 또는 4시간(hpi)에서 APRG64 또는 아피제닌으로 처리하면 IAV의 M1 및 NP RNA 발현 수준 역시 감소하였다(도 8c). 이와 같은 결과에 따라 APRG64 및 아피제닌이 바이러스 부착 및 진입을 포함하는 IAV 복제의 초기 단계를 억제하는 것이 확인되었다.

[0269] 실험예 6-3. RNA 중합효소 활성 억제에 따른 APRG64 및 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성 확인

[0270] 바이러스 음성(-) RNA 가닥을 양성(+) RNA 가닥으로 전사하는 IAV RNA-의존성 RNA 중합효소(RdRP)의 활성은 IAV 복제에 중요한 역할을 수행하는데, RdRP 활성은 IAV M1 및 NP의 (+) RNA 가닥의 발현 수준에 의해 측정될 수 있다. 따라서, APRG64 및 아피제닌 처리에 따른 IAV M1 및 NP의 (+) RNA 가닥의 발현 수준을 분석하여 IAV RdRP 활성에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시켰다. 5 hpi에서 바이러스 M1 및 NP RNA의 (+) 가닥이 급격히 증가했기 때문에 5 hpi에서 세포에 APRG64($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 아피제닌($5\mu\text{g}/\text{ml}$)을 각각 처리하고 IAV M1 및 NP의 발현 수준을 측정하였다.

[0272] 그 결과, APRG64 및 아피제닌은 (+) 가닥 M1 및 NP의 RNA의 합성을 각각 유의하게 억제하여 IAV RdRP 활성을 억제하는 것으로 확인되었다(도 8d).

[0274] 실험예 6-4. MAPK 활성 억제에 따른 APRG64 및 아피제닌의 IAV 복제 억제 활성 확인

[0275] APRG64 및 아피제닌이 IAV 복제에 필요한 것으로 알려진 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 경로의 활성화에 영향을 미치는지 알아보기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, MDCK 세포를 0.1 MOI에서 1시간 동안 IAV로 감염시킨 다음 APRG64($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 아피제닌($5\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 처리하였고, 6 hpi에서 ERK(세포외 신호 조절 단백질 키나아제), p-ERK, SAPK(스트레스 활성화 단백질 키나아제), p-SAPK 및 액틴의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 측정하였으며, 모든 그래프는 3회 반복의 평균을 나타낸다.

[0277] 그 결과, IAV 감염은 ERK 및 SAPK의 인산화를 극적으로 유도하였으나, 이러한 증가는 APRG64 또는 아피제닌이 처리된 세포에서는 관찰되지 않았다(도 8e).

[0279] 종합하면, 이러한 결과는 APRG64 및 아피제닌이 바이러스 부착, 진입, RdRP 활성화 및 MAPK 신호 전달 경로를 타겟하여 IAV 복제의 여러 단계를 억제한다는 것이 확인되었다.

[0281] 실험예 7. 마우스 모델에서 비강 투여에 따른 APRG64 및 아피제닌의 우수한 바이러스 효과 확인

[0282] 실험예 2 내지 6의 in vitro 효과가 생체 내에서도 유지되는지 여부를 확인하기 위하여, 마우스 모델에 APRG64 및 아피제닌을 비강 투여하여 항바이러스 효과를 확인하였다. 구체적으로, 야생형 C57BL/6 마우스를 1×10^3 pfu의 IAV로 감염시킨 후 10분, 3시간 및 6hpi에서 마우스를 PBS(용매 대조군), 0.5mg/kg의 APRG64 또는 0.25mg/kg의 아피제닌(n = 5)으로 비강 내 처리하였다(도 9a). 감염 후 5일(dpi)에, 플라크 분석을 통해 폐의 감염성 바이러스 입자의 수를 측정하였다. 이외에는 실험예 2-2에 따른 플라크 분석 방법과 동일한 조건으로 수행하였다.

[0284] 그 결과, APRG64 및 아피제닌은 폐에서 IAV 역가를 유의하게 감소시키는 것으로 확인되었다는 점에서(도 9b),

APRG64 및 아피제닌의 시험관 내 항바이러스 효과는 생체 내에서도 우수한 것으로 확인되었다.

[0286] **실험예 8. 마우스 모델에서의 APRG64 경구 투여에 따른 우수한 바이러스 효과 확인**

[0287] 실험예 8-1. APRG64의 경구투여에 따른 마우스 체중 감소 여부 확인

[0288] 6주령 C57BL/6 수컷 마우스를 사용하였고, 투여된 바이러스의 경우 안전성이 확보되어 있으나, 다른 설치류의 감염을 우려하여 네거티브(negative) 사육 시스템을 사용해 다른 동물과의 접촉을 차단하였다. 바이러스의 분리, 동정, 역가 계산 및 투여는 그 안전성을 확보하기 위하여 준비된 특수 클린벤치(clean bench)에서 실시하였으며, 바이러스 소독을 위한 특수 소독제를 이용하여 실험 전후 소독을 실시하였다. 체중에 직접적인 영향을 줄 수 있는 사료 급여 관리는 매일 사료의 양을 판단하여 급여함으로써 급식에 제한이 발생하지 않도록 하였다. 조명은 12시간 주기로 교체하였고, 물과 사료를 자유롭게 먹도록 하였다. 기타 동물 사육과 관련되는 사항은 중앙대학교 동물실험 윤리위원회(National Association of Laboratory Animal Care) 규정에 따라 동물실험을 수행하였다.

[0289] 상기 방법에 따라 준비된 마우스를 마취한 뒤 IAV를 1×10^3 pfu로 비강을 통해 감염시켰으며, APRG64(0.5mg/kg)을 IAV 감염 3일 전부터 감염 5일 후까지 총 8일 동안 경구투여하였다(도 10a). APRG64의 경구투여에 따른 항인플루엔자 효능을 평가하기 위해서 8일 동안의 APRG 경구 투여에 따른 마우스 체중 변화를 관찰하였다.

[0291] 그 결과, 대조군에서는 IAV 감염 후부터 체중의 감소가 나타났지만, APRG64 경구 투여군에서는 대조군에 대비 체중 감소가 억제되는 것이 확인되었다(도 10b).

[0293] 실험예 8-2. APRG64의 경구투여에 따른 마우스 사망 억제 효과 여부 확인

[0294] 동물 실험은 한국파스퇴르연구소 동물관리위원회에서 승인한 프로토콜(승인번호: IPK-21,003)에 따라 수행되었고, 6~7주 된 C57BL/6 수컷 마우스를 실험에 사용하였으며, 경구 투여를 위해 마우스를 하루에 한 번 200 μ l의 증류수 함유 APRG64(50mg/kg)로 위내 처리하였다.

[0295] APRG64를 마우스에 경구 투여하였을 때 IAV에 의한 사망 효과가 억제되는지를 확인하였다. 구체적으로, 상기와 같이 준비된 야생형 C57BL/6 마우스에 0, 25 또는 50mg/kg의 APRG64를 3일 동안 경구 투여한 후 1×10^3 pfu의 IAV로 감염시켰다. 또한, 마우스에 추가로 5일 동안 APRG64를 경구 투여하여 마우스 생존을 14일 동안 모니터링 하였다.

[0297] 그 결과, 마우스는 용량 의존적 방식으로 IAV에 의한 사망으로부터 유의하게 보호되는 것으로 확인되었다(도 10c). 구체적으로, APRG64를 투여하지 않은 마우스군은 10일에 모두 사망한 반면, APRG64 처리군은 14일 동안 모두 생존을 유지하였다. 특히, 50mg/kg의 APRG64를 투여한 마우스의 생존률은 80% 이상으로 나타나, IAV에 대한 항바이러스 효과가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.

[0299] 실험예 8-4. APRG64의 경구투여에 따른 감염성 바이러스 입자 감소 효과 확인

[0300] APRG64의 경구투여에 따른 감염성 바이러스 입자 감소 효과 확인하기 위하여 마우스 폐의 바이러스 RNA, 사이토카인 및 감염성 바이러스 입자를 RT-qPCR 또는 플라크 분석으로 분석하였다. 구체적으로, 실험예 8-3의 경구 투여를 위해 준비된 야생형 C57BL/6 마우스에 50 mg/kg의 APRG64를 3일 동안 경구 처리한 다음, 마우스를 1×10^3 pfu의 IAV로 감염시킨 후, 5일 동안 추가적으로 동일한 양의 APRG64를 처리하였다. 5dpi에서 마우스 폐를 채취하여 바이러스 RNA, 역가 및 염증성 사이토카인의 생산을 분석하여 IAV의 M1 및 NP의 상대적 mRNA 발현 수준 및 감염성 바이러스 역가를 확인하였으며, 염증성 사이토카인인 IFN- γ , TNF- α 및 IL-6의 상대적 발현 수준을 RT-qPCR로 분석하였다.

표 3

구분(내용)	방향	서열
서열번호 7(IFN- γ primer)	forward	5'-GGCCATCAGCAACAACATAAGCGT-3'
서열번호 8(IFN- γ primer)	reverse	5'-TGGGTGTTGACCTCAAACCTGGC-3'
서열번호 9(TNF- α primer)	forward	5'-GCCTCTTCTCATTCTGCTTG-3'
서열번호 10(TNF- α primer)	reverse	5'-CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'
서열번호 11(IL-6 primer)	forward	5'-ACGGCCTTCCCTACTTCACA-3'
서열번호 12(IL-6 primer)	reverse	5'-CATTCCACGATTCCAGA-3'

그 결과, 바이러스 RNA(도 10d 왼쪽 및 중앙 그래프) 및 감염성 바이러스 입자(도 10d 오른쪽 그래프)는 5dpi에서 처리되지 않은 마우스의 폐와 비교하였을 때 APRG64 처리 마우스의 폐에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한, IAV 감염에 따라 유도된 IFN- γ , TNF- α 및 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인의 발현은 APRG64 경구 투여에 의해 유의하게 억제되는 것으로 확인되었다(도 10e). 이와 같은 결과는 APRG64가 지질다당류(LPS)로 자극된 비장세포에서 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시킨다는 시험관 내 사이토카인 발현 결과와 일치하였다.

상기의 실험에 따라 APRG64가 안전하면서도 현저히 우수한 효과를 나타내는 비강 및 경구 투여 가능한 약물로서 IAV 감염을 치료하는 데 사용될 수 있음이 종합적으로 시사되는 것이다.

실험예 9. APRG64 유래 화합물의 분자도킹 시뮬레이션을 통한 인플루엔자 바이러스 억제능 평가

APRG64 유래 화합물에 대하여 인플루엔자 바이러스에 대해 분자도킹 시뮬레이션을 수행하여 바이러스 억제능을 평가하였다.

구체적으로, 인플루엔자 A/H1N1에 대하여 분자 모델링을 진행하였으며, 상기 화합물은 해당 바이러스에서 복제 및 전사에 영향을 주는 subunit viral RdRp (PA, PB1, PB2)과 연속적으로 결합한다. 따라서 본 발명에서는, subunit viral RdRp (PA, PB1, PB2)에 대해 blind docking으로 진행하였다. 특히, PB2의 경우 C-terminal domain, Middle domain 및 Cap binding domain에 대해 분자도킹 시뮬레이션을 수행하였다. 또한 인플루엔자 바이러스는 코로나바이러스(SARS-CoV-2)의 스파이크 단백질과 마찬가지로 Receptor binding domain (RBD)이 존재한다. RBD; 및 RBD가 cell 내에 들어간 후, 갖고 있던 RNA를 세포 내에 내보내기 전에 세포막이 융합되는 과정에서 주요한 역할을 하는 곳인 A pocket;에 대하여 PDB 파일을 확보하여 분자도킹 시뮬레이션을 수행하였다. 도킹 결과는 Kcal/mol 단위의 결합 친화도의 형태로 얻어졌고, 도킹 과정은 별도의 10개의 컴퓨터 시스템에서 10번 되풀이하여 수행하였다. 결합 모드는 Discovery Studio 4.0을 이용하여 시각화하였고, 분자의 상호작용을 확인하기 위해 2차원 또는 3차원 이미지를 이용하였다. 그 결과는 도 11a 내지 도 11c에 나타내었다. 또한, 화합물의 도킹 후에 계산된 평균 결합 에너지 값을 표 4에 나타내었다.

도 11a 내지 도 11c 및 표 4에 나타난 바와 같이, 3종의 APRG64 유래 화합물에서 인플루엔자 바이러스의 3차원 구조 기반 결합(docking)을 통하여 높은 인실리코 결합능을 보이는 것을 확인하였다. 그 중에서 화합물 9인 우르솔산이 가장 높은 억제능을 보이는 것을 확인하였다.

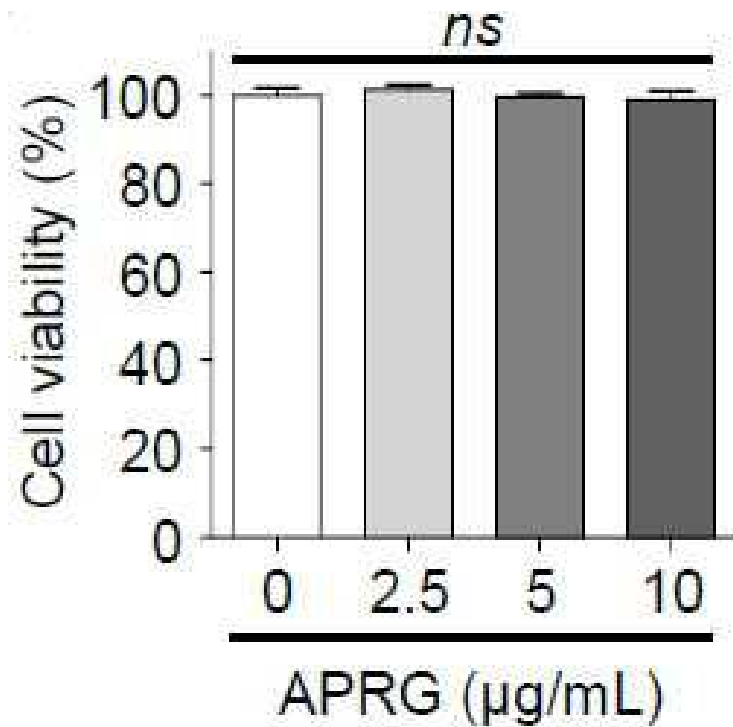
표 4

Compounds	Average Binding Affinity (Kcal/mol)						
	PA	PB1	PB2			RBD	A pocket
			C-terminal domain	Middle domain	Cap binding domain		
화합물 10	-8.93	-1.68	-5.55	-0.47	-3.86	-5.26	-5.57
화합물 9	-10.71	-6.47	-11.70	-8.55	-8.60	-10.33	-8.07
화합물 6	-6.01	-4.24	-6.08	-5.20	-6.52	-6.43	-9.45

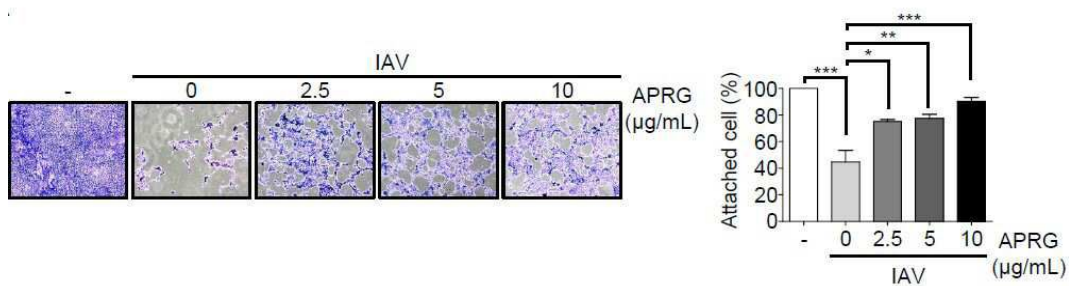
[0315] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

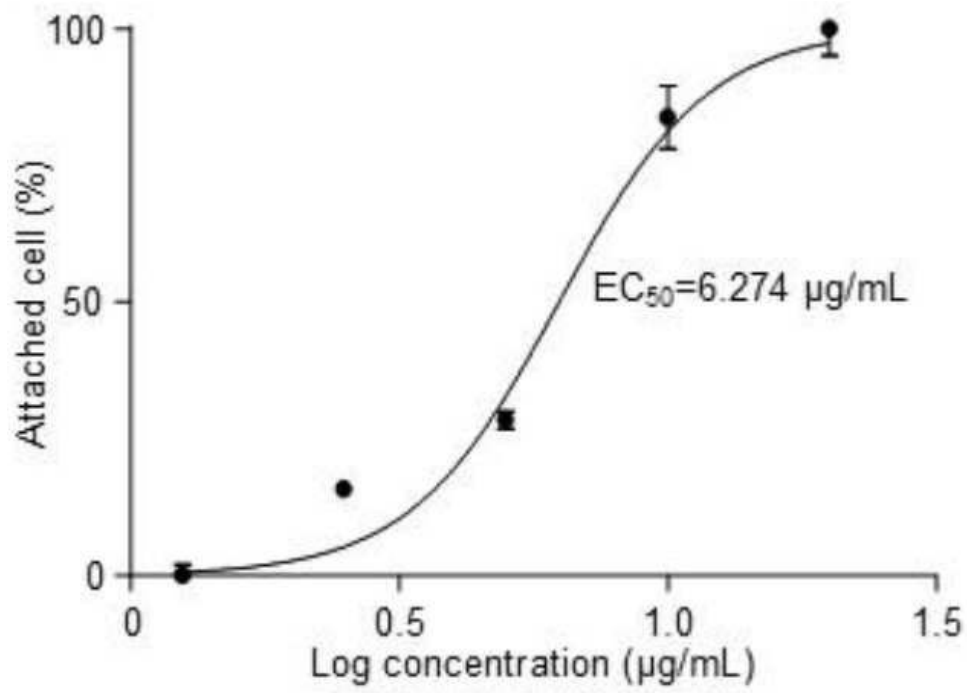
도면1



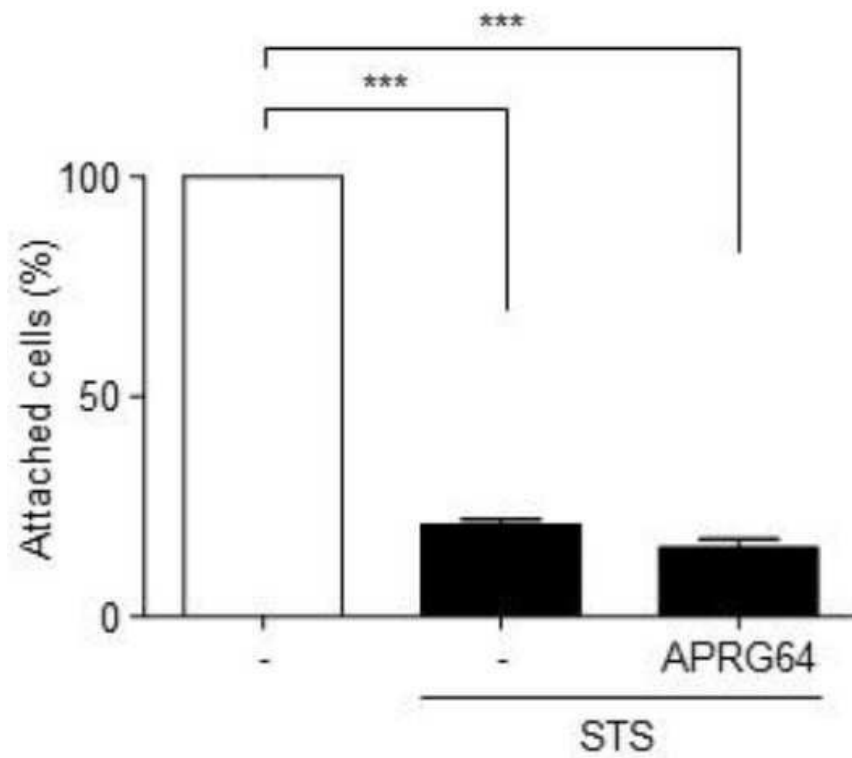
도면2a



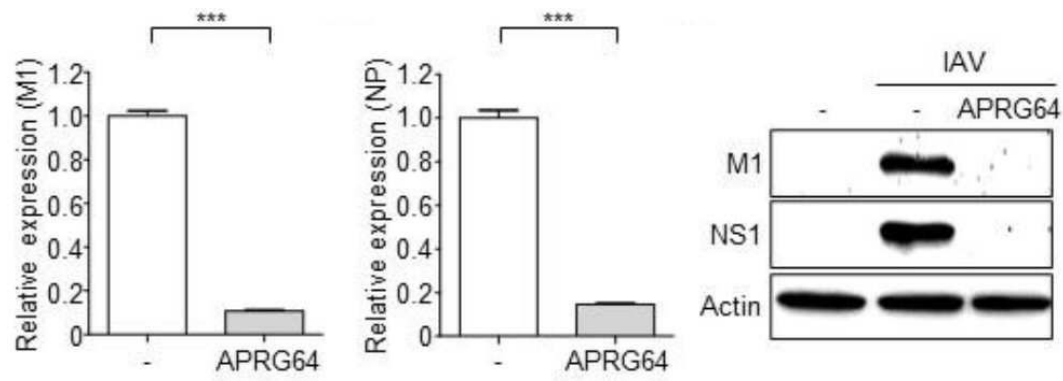
도면2b



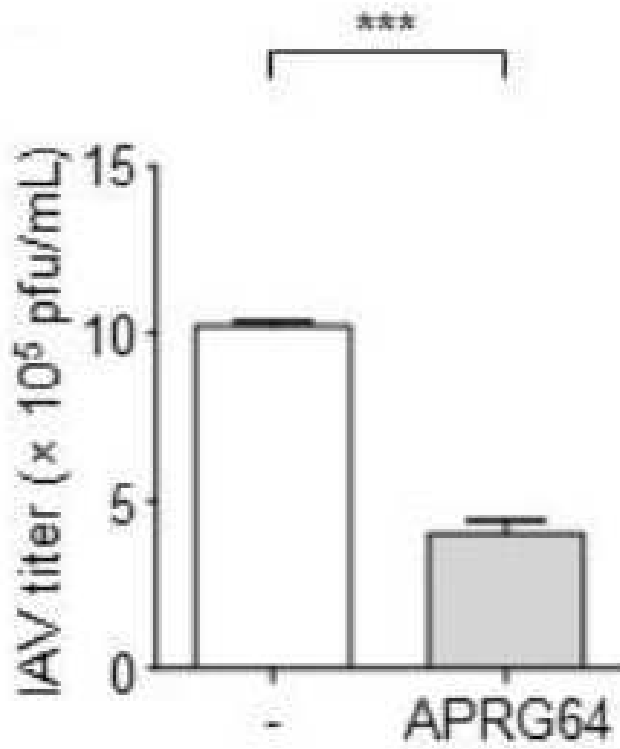
도면2c



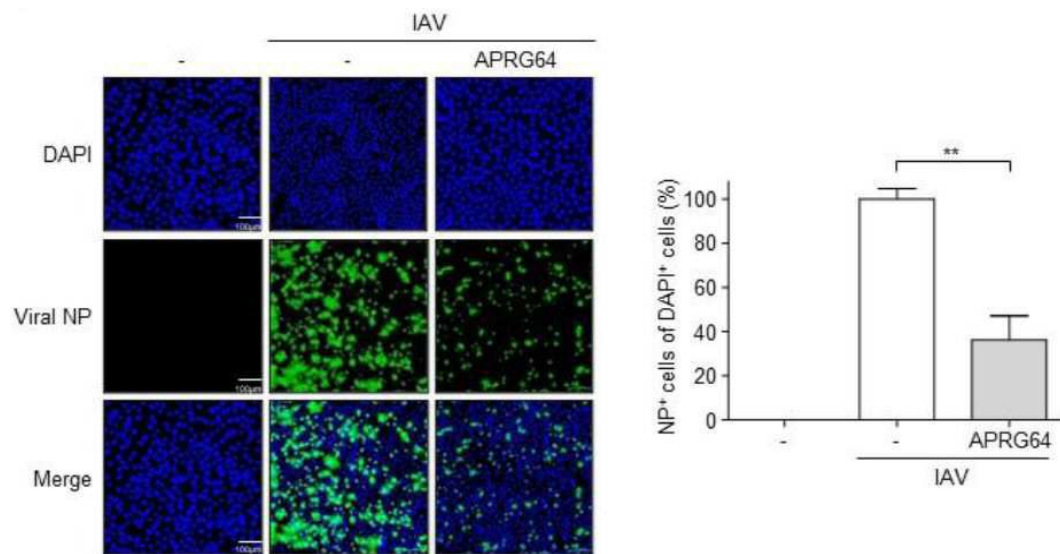
도면3a



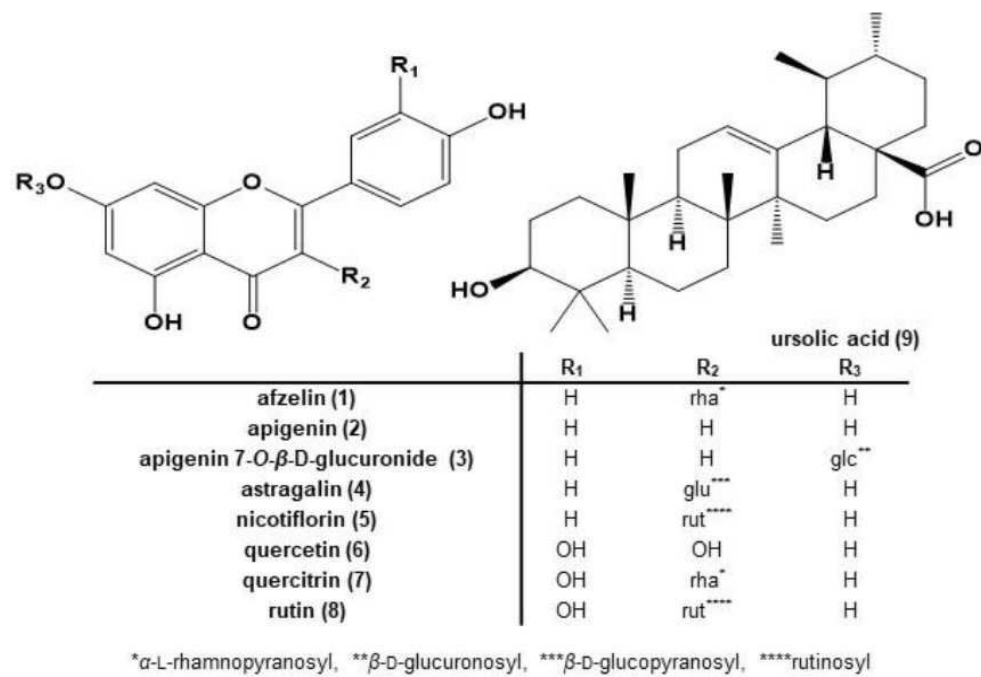
도면3b



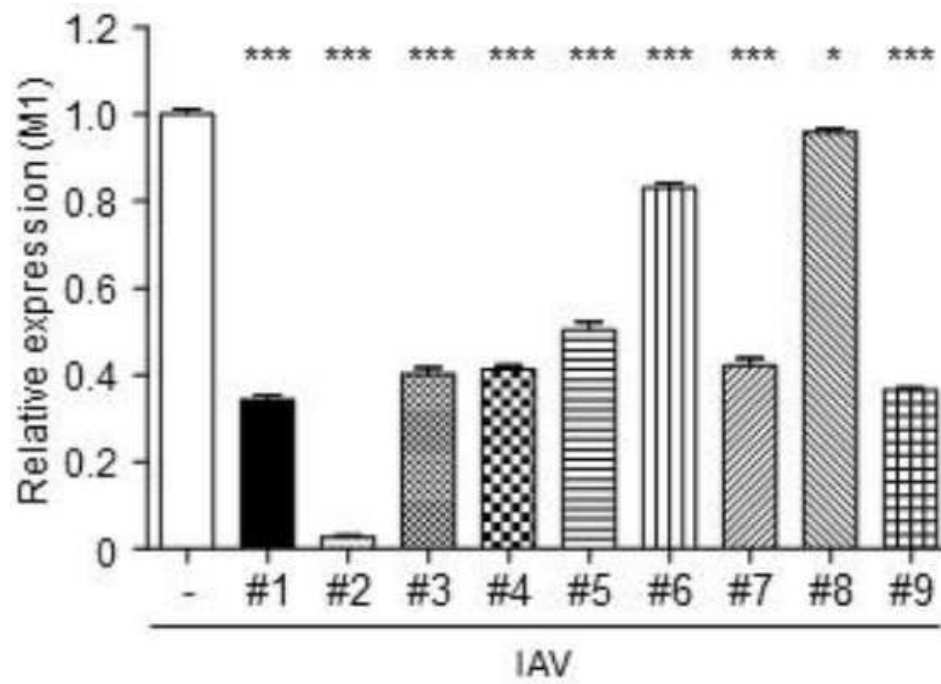
도면3c



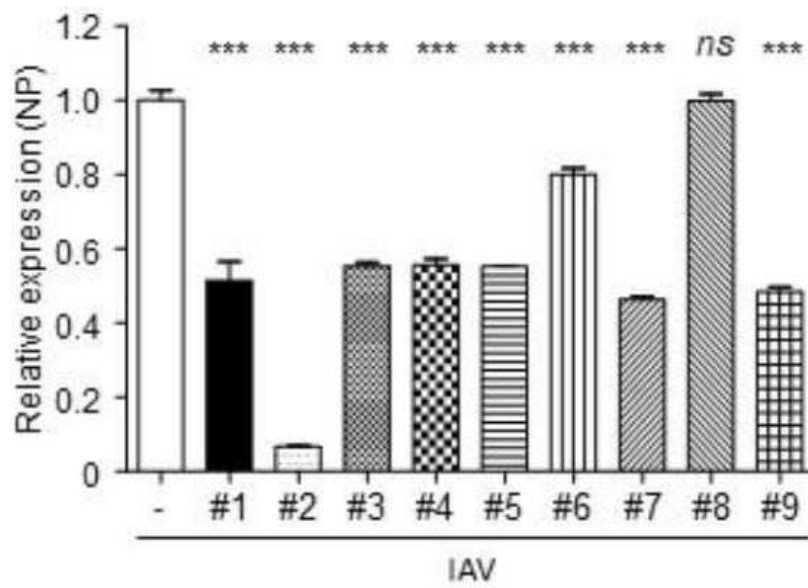
도면4



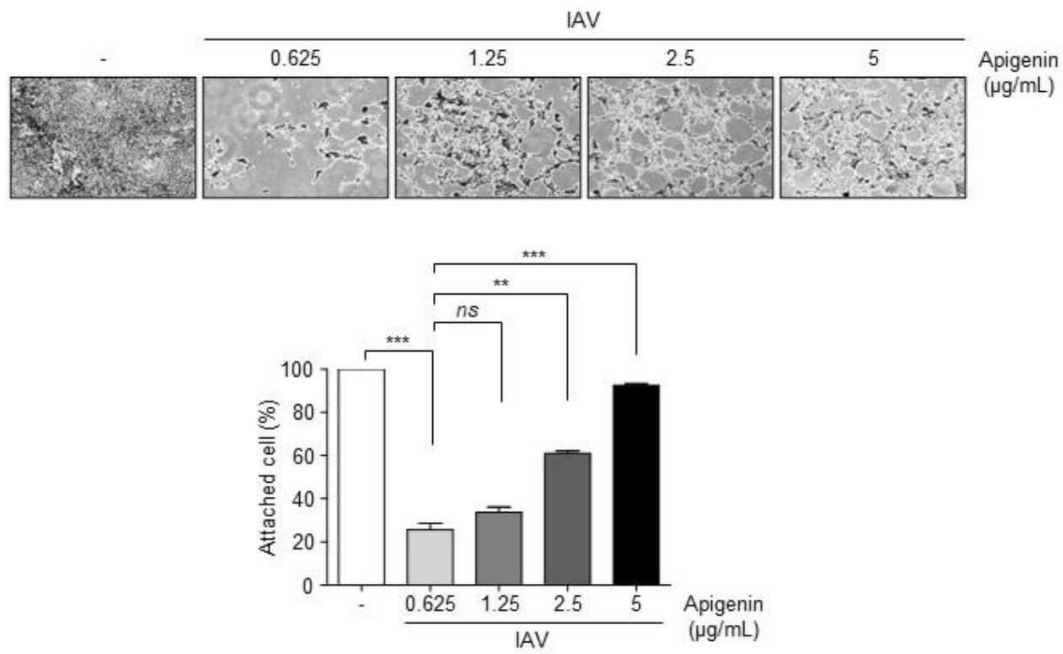
도면5a



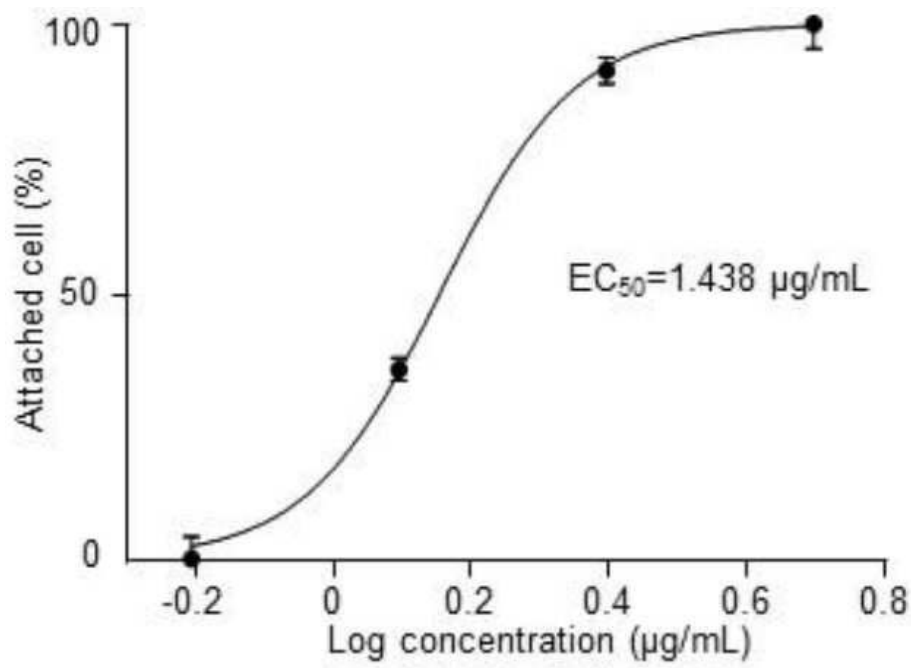
도면5b



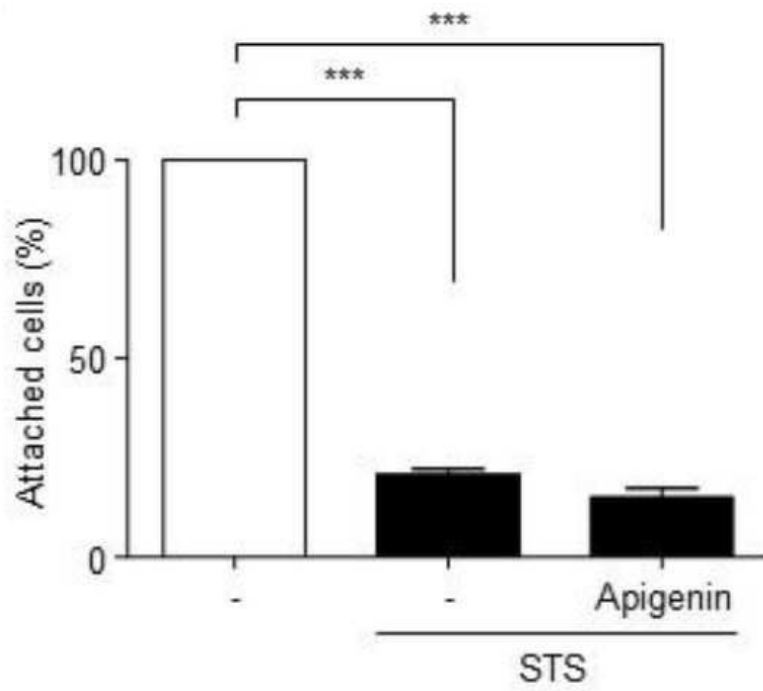
도면6a



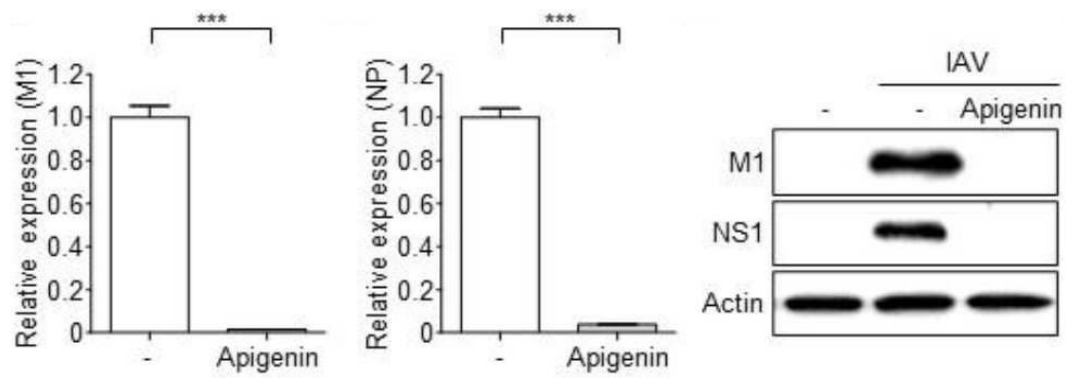
도면6b



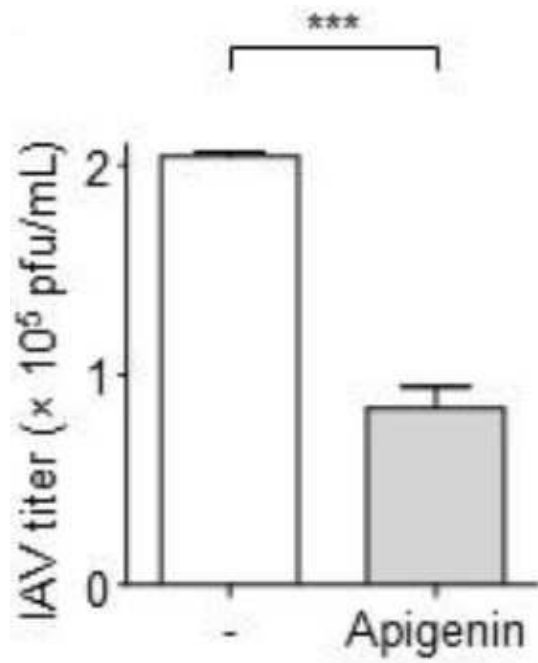
도면6c



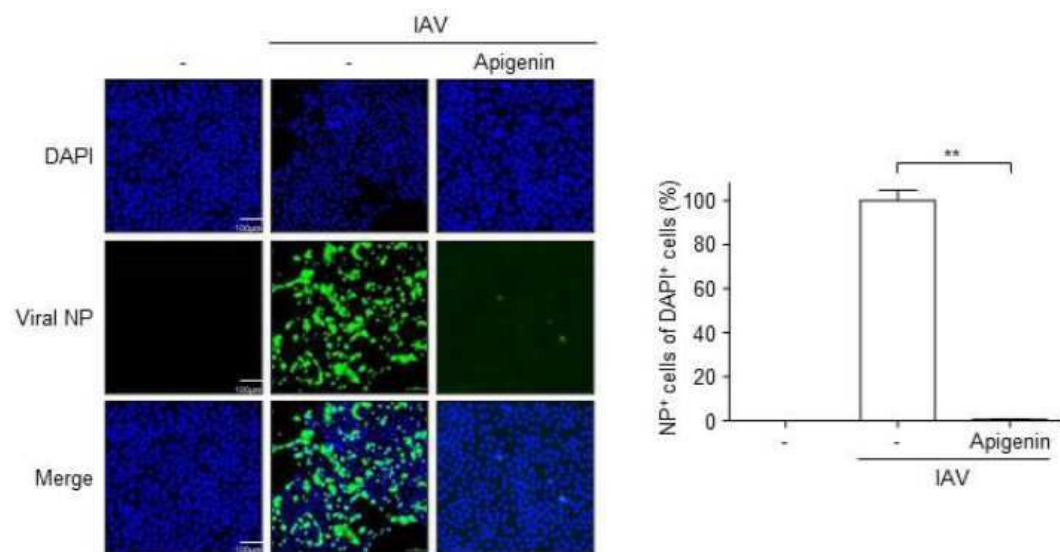
도면7a



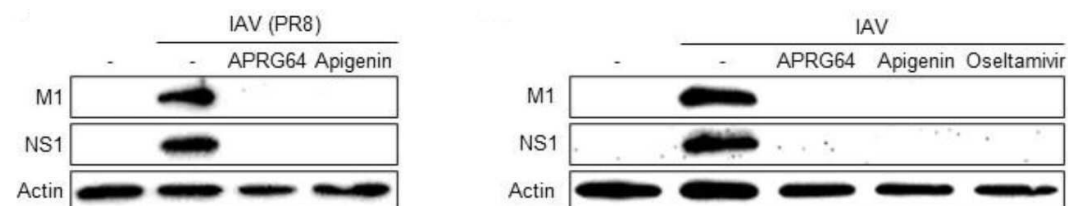
도면7b



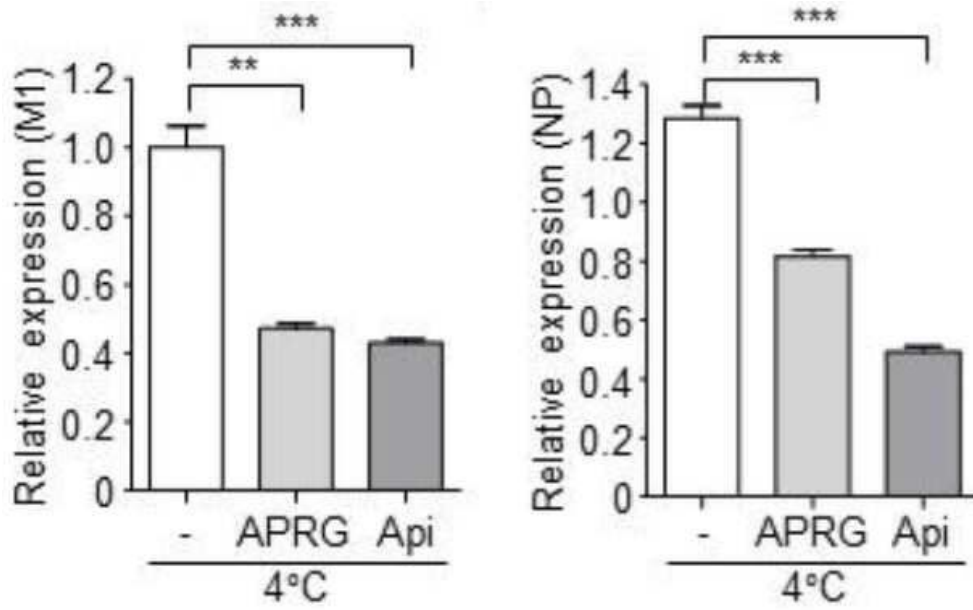
도면7c



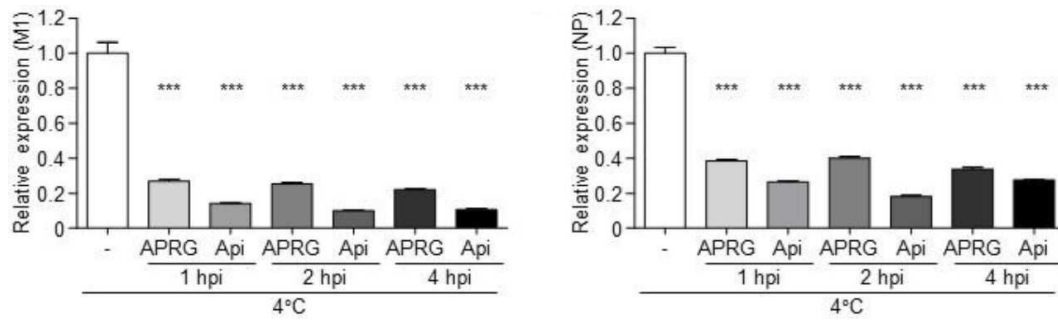
도면8a



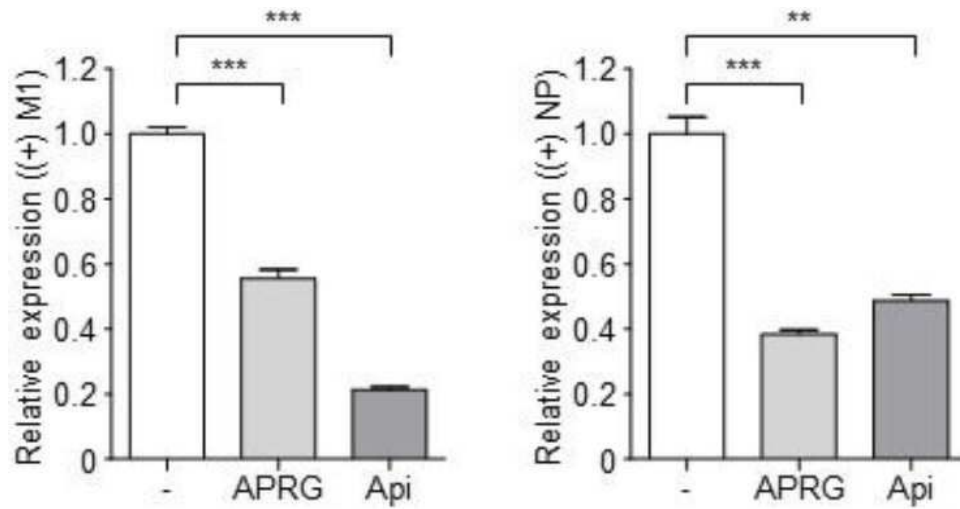
도면8b



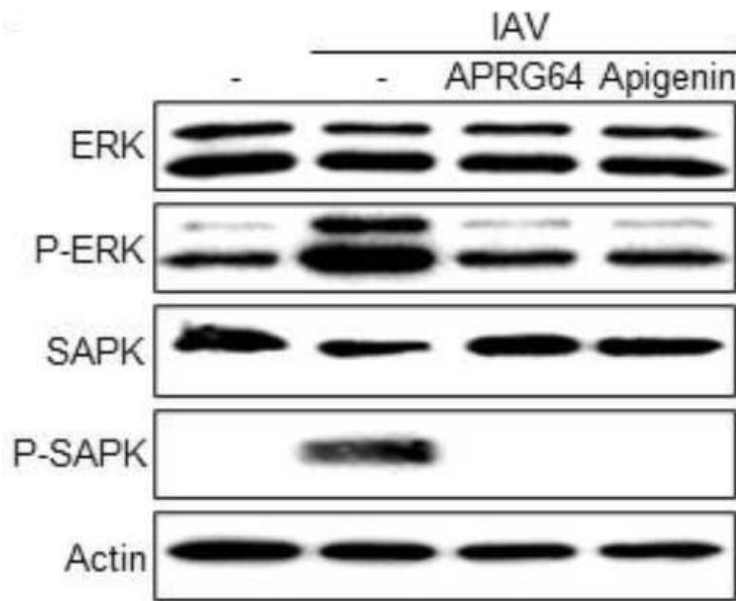
도면8c



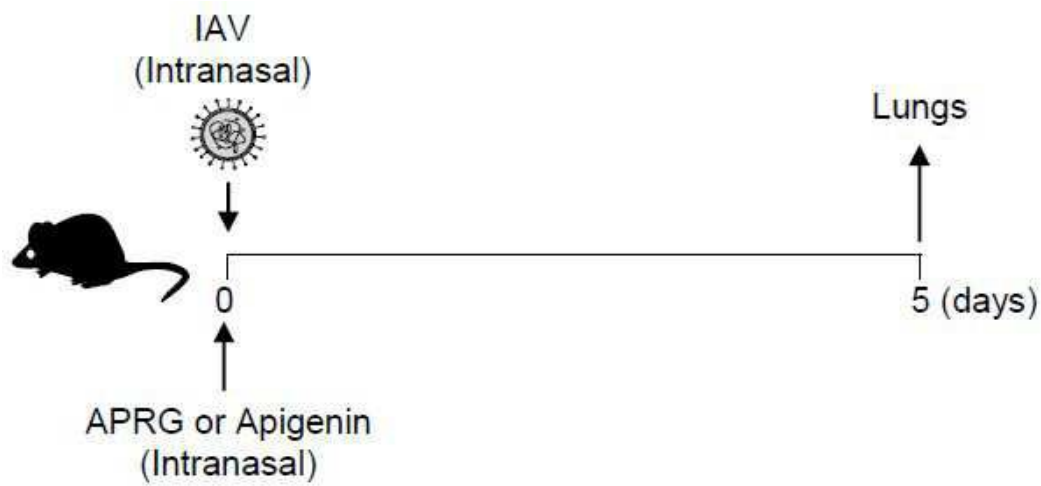
도면8d



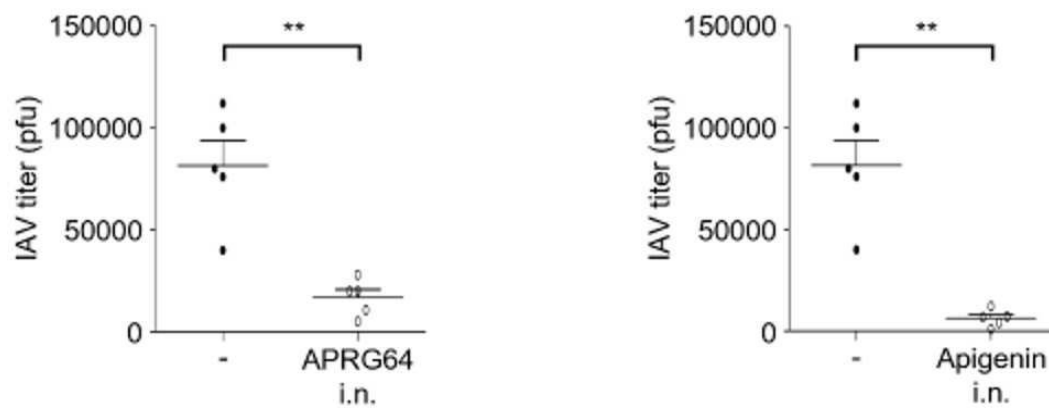
도면8e



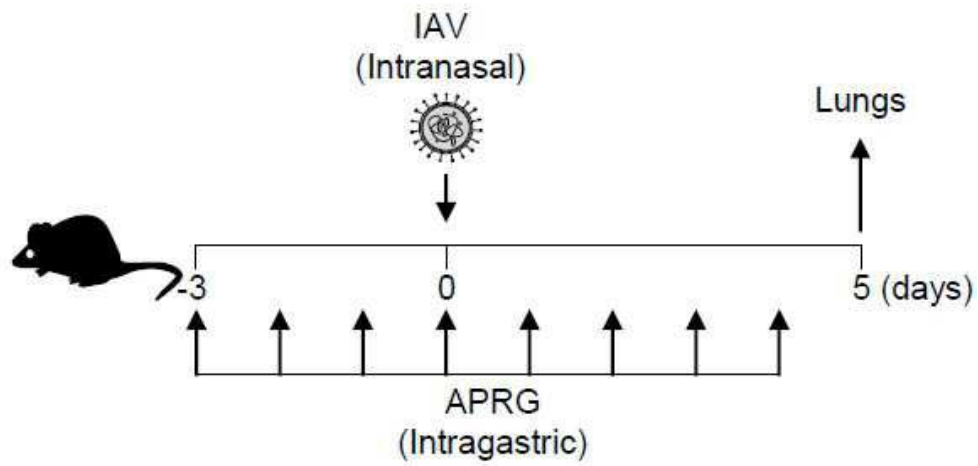
도면9a



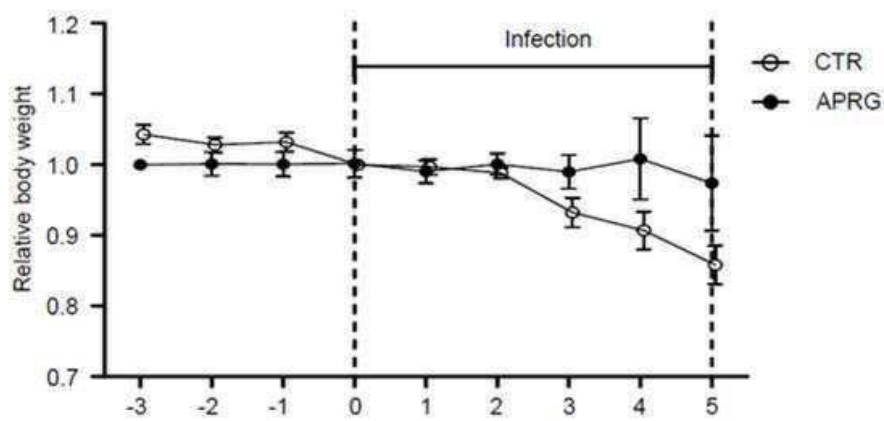
도면9b



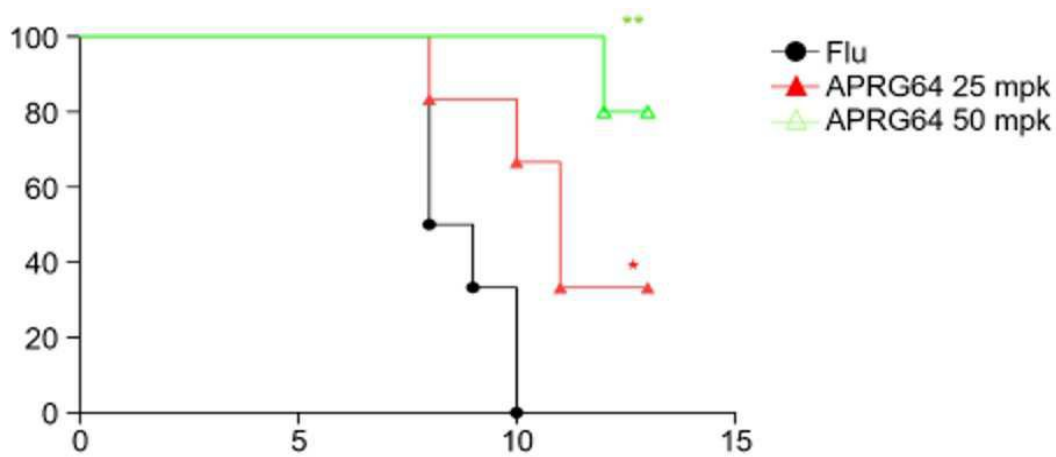
도면10a



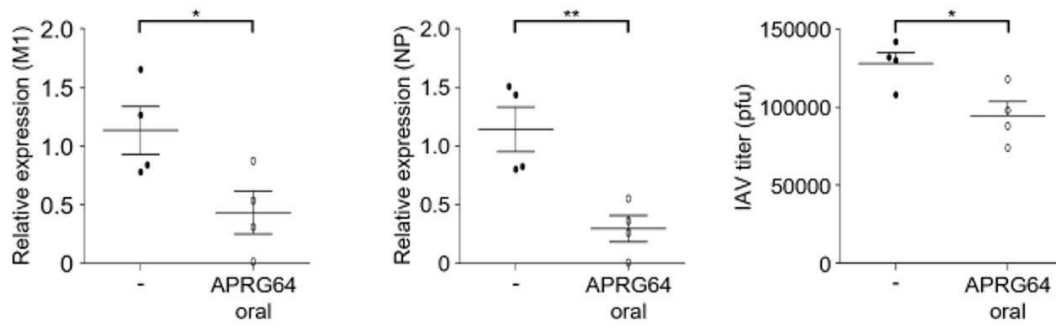
도면10b



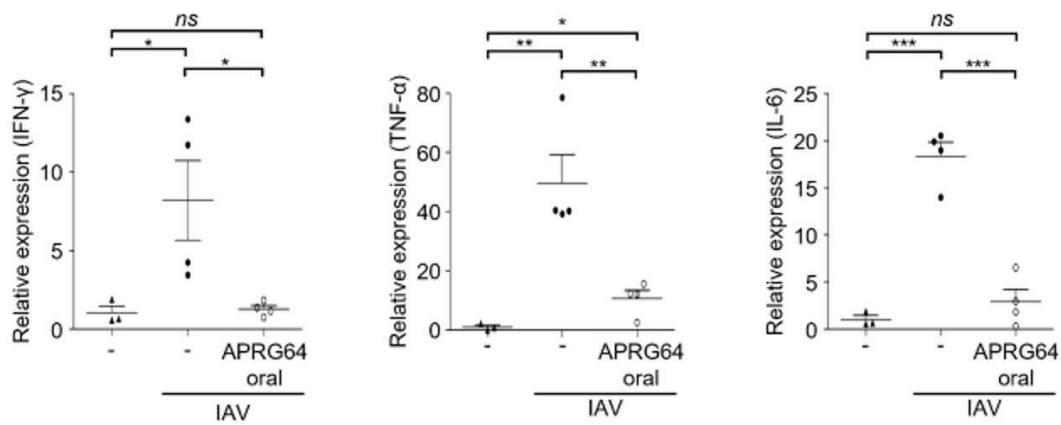
도면10c



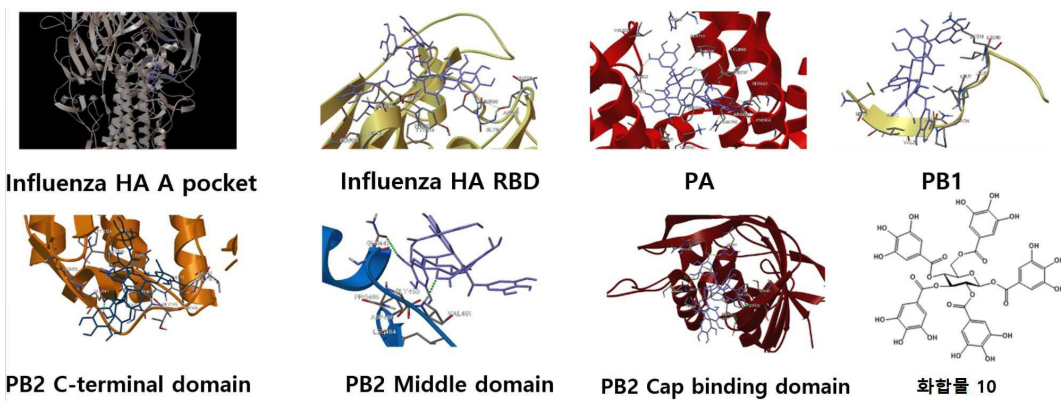
도면10d



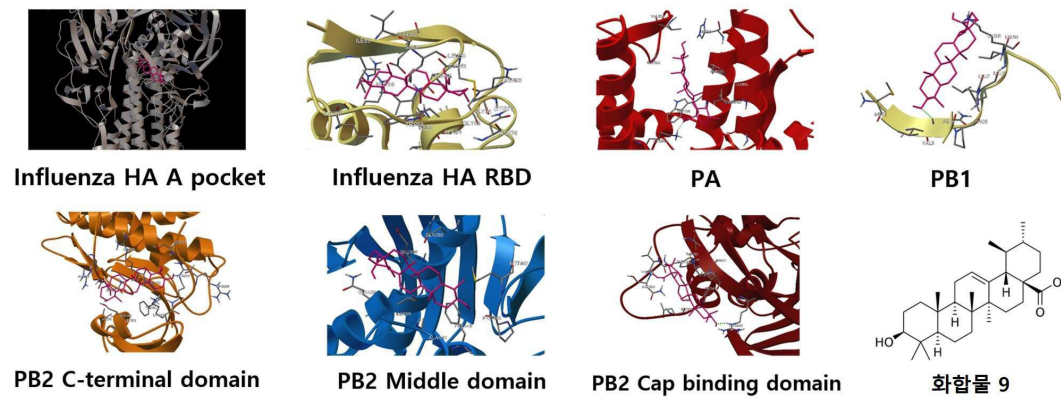
도면10e



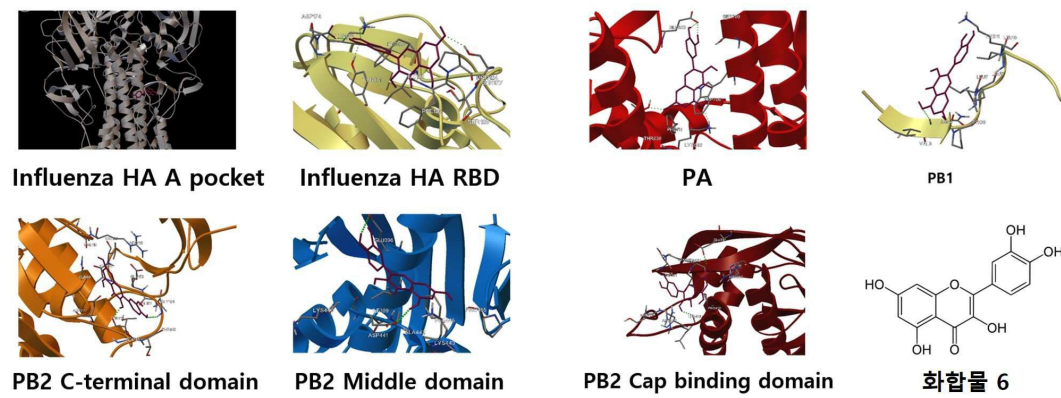
도면11a



도면11b



도면11c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.